

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 :		A1	(11) Numéro de publication internationale : WO 94/28152
C12N 15/86, 15/34, 5/10, A61K 48/00, C12N 15/12, 7/04, 15/23, A61K 39/235, C12N 15/31			(43) Date de publication internationale: 8 décembre 1994 (08.12.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00624		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 27 mai 1994 (27.05.94)		Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(30) Données relatives à la priorité: 93/06482 28 mai 1993 (28.05.93) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): IMLER, Jean-Luc [FR/FR]; 5a, rue des Mincures, F-67000 Strasbourg (FR). METHALLI, Majid [FR/FR]; 10, boulevard Tauler, F-67000 Strasbourg (FR). PAVIRANI, Andréa [FR/FR]; 13, avenue du Général-de-Gaulle, F-67000 Strasbourg (FR).			
(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Reginbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			
(54) Title: DEFECTIVE ADENOVIRUSES AND CORRESPONDING COMPLEMENTATION LINES			
(54) Titre: ADENOVIRUS DEFECTIFS ET LIGNEES DE COMPLEMENTATION CORRESPONDANTES			
(57) Abstract			
<p>Novel defective adenoviruses for the transfer and expression of an exogenous nucleotide sequence in a host cell or organism. The invention also relates to novel complementation lines and to the process for the preparation of these novel defective adenoviruses and their use in therapy and to a pharmaceutical composition containing same.</p>			
<p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet de nouveaux adénovirus déficients pour le transfert et l'expression d'une séquence nucléotidique exogène dans une cellule ou un organisme hôte. L'invention est également relative à de nouvelles lignées de complémentation et le procédé de préparation de ces nouveaux adénovirus déficients ainsi que leur usage thérapeutique et une composition pharmaceutique les contenant.</p>			
<p style="text-align: right;">pTG6303</p>			

Best Available Copy

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SI	Slovénie
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	Slovaquie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CN	Chine	LU	Luxembourg	TG	Togo
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettovie	TJ	Tadjikistan
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	ML	Mal	UZ	Ouzbékistan
FI	Finlande	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FR	France				
GA	Gabon				

5

10

ADENOVIRUS DEFECTIFS ET LIGNÉES DE COMPLÉMENTATION CORRESPONDANTES

15

L'invention a pour objet de nouveaux vecteurs adénoviraux défectifs permettant le transfert et l'expression de gènes d'intérêt dans une cellule ou un organisme eucaryote hôte ainsi que de nouvelles lignées de complémentation complémentant *en trans* les fonctions virales essentielles qui ont été déletées du génome de ces adénovirus recombinants. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

Les adénovirus sont des virus à ADN qui présentent un large spectre d'hôte. Ils ont été mis en évidence dans de nombreuses espèces animales et de nombreux types cellulaires. Il existe plusieurs sérotypes qui diffèrent notamment au niveau de la séquence de leurs génomes. La plupart des adénovirus humains sont peu pathogènes et ne produisent généralement que des symptômes bénins.

L'adénovirus pénètre dans la cellule hôte permissive par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, puis il est internalisé et passe dans des endosomes. Leur acidification contribue à un changement de conformation du virus et à sa sortie dans le cytoplasme. Puis, l'ADN viral associé à certaines protéines virales nécessaires aux premières étapes du cycle réplicatif, pénètre dans le noyau des cellules infectées où sa transcription est initiée par des enzymes cellulaires. La réplication de l'ADN adénoviral a lieu dans le noyau des cellules infectées et ne nécessite pas la réplication cellulaire. L'assemblage des nouveaux virions prend également place dans le noyau. Dans un premier temps, les protéines virales s'assemblent de manière à former des capsides vides de structure

icosaedrique, dans lesquelles l'ADN adénoviral est ensuite encapsidé. Les particules virales ou virions sont libérés des cellules infectées et sont susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives.

5 Le cycle infectieux de l'adénovirus s'effectue en 2 étapes :

- la phase précoce qui précède l'initiation de la réPLICATION du génome adénoviral et qui permet la production des protéines régulatrices intervenant au niveau de la réPLICATION et de la transcription de l'ADN viral, et
- la phase tardive qui conduit à la synthèse des protéines structurales.

D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb de long qui contient les séquences codant pour plus de 30 protéines. A chacune de ses extrémités, est présente une courte séquence de 100 à 150 nucléotides selon les sérotypes, inversée et désignée ITR (Inverted Terminal Repeat). Les ITRs sont impliqués dans la réPLICATION du génome adénoviral. La région d'encapsidation, d'environ 300 nucléotides, est située à l'extrémité 5' du génome juste après l'ITR 5'.

Les gènes précoces sont répartis en 4 régions qui sont dispersées dans le génome adénoviral, désignées E1 à E4 (E pour "Early" signifiant précoce en anglais). Les régions précoces comprennent au moins six unités transcriptionnelles qui possèdent leurs propres promoteurs. L'expression des gènes précoces est elle-même régulée, certains gènes étant exprimés avant d'autres. Trois régions, respectivement E1, E2 et E4, sont essentielles à la replication virale. Ainsi, si un adénovirus est défectif pour l'une de ces fonctions, c'est à dire s'il ne peut pas produire au moins une protéine codée par l'une de ces régions, celle-ci devra lui être fournie *en trans*.

La région précoce E1 est située à l'extrémité 5' du génome adénoviral et contient 2 unités de transcription virales, respectivement E1A et E1B. Cette région code pour des protéines qui interviennent très précoceMENT dans le cycle viral et sont essentielles à l'expression de presque tous les autres gènes de l'adénovirus. En particulier, l'unité de transcription E1A code pour une protéine trans-activatrice de la transcription des autres gènes viraux, qui induit la transcription à partir des promoteurs des régions E1B, E2A, E2B et E4.

Les produits de la région E2, laquelle comprend également deux unités de transcription E2A et E2B, sont directement impliqués dans la réPLICATION de l'ADN viral. Cette région gouverne notamment la synthèSE d'une protéINE de 72kDa, qui présente une forte affinité pour l'ADN simple brin et d'une ADN polyméRASE.

5

La région E3 n'est pas essentielle à la réPLICATION du virus. Elle code pour au moins six protéINES qui seraient responsables de l'inhibition de la réponse immune de l'hôte vis à vis d'une infection par adénovirus. En particulier, la glycoprotéINE gp19kDa empêcherait la réponse CTL, responsable de la cytolYSE des cellules infectées par les cellules T cytotoXiques de l'hôte.

10 La région E4 est située à l'extrémité 3' du génome adénoviral. Elle code pour de nombreux polypeptides qui sont impliqués dans l'expression des gènes tardifs, la stabilité des messagers (ARNm) tardifs, le passage de la phase précoce à la phase tardive ainsi 15 que l'inhibition de la synthèSE protéIQUE cellulaire.

Une fois la réPLICATION de l'ADN viral initiée, la transcription des gènes tardifs déBute. Ceux-ci occupent la majorité du génome adénoviral et recouvrent en partie les unités de transcription des gènes précoces. Mais ils sont transcrits à partir de promoteurs différents 20 et selon un mode d'épissage alternatif, de sorte que les mêmes séquences sont utilisées à des fins différentes. La plupart des gènes tardifs sont transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (Major Late Promoter). Ce promoteur permet la synthèSE d'un long transcrit primaire qui est ensuite maturé en une vingtaine d'ARN messagers (ARNm) à partir desquels sont produites les protéINES capsidaires du virion. Le gène codant pour la 25 protéINE structurale IX composant la capsidE est situé à l'extrémité 5' du génome adénoviral et recouvre la région E1B à son extrémité 3'. L'unité transcriptionnelle de la protéINE IX utilise le même signal de terminaison de la transcription que l'unité transcriptionnelle E1B.

- 30 Un certain nombre d'adénovirus sont maintenant bien caractérisés génétiquement et biochimiquement. Tel est le cas de l'adénovirus humain de type 5 (Ad5) dont la séquence est divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260. Les différents gènes ont pu être localisés précisément sur le génome adénoviral qui comprend de 5' vers 3' l'ITR 5' de 103 bp suivi de la région d'encapsidation (Hearing et al., 1987, J. Virol., 61, 2555-2558) d'environ 300 pb, puis des régions précoces et tardives dont l'emplacement est schématiquement représenté dans la Figure 1, et enfin de l'ITR 3'.
- 35

- Il ressort de ce qui précède que les adénovirus possèdent des caractéristiques intéressantes qui sont d'eux des vecteurs de choix pour le transfert de gènes d'intérêt. De nombreux adénovirus recombinants sont décrits dans la littérature (Rosenfeld et al., 1991, *Science*, 252, 431-434 ; Rosenfeld et al., 1992, *Cell*, 68, 143-155). D'une manière générale, ils dérivent de l'Ad5 et sont défectifs pour la fonction E1, afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. En outre, la région E3 non-essentielle peut également être déletée. Les séquences exogènes sont intégrées à la place de la région E1 ou E3.
- Ainsi, ces adénovirus défectifs ne peuvent être propagés que dans une lignée cellulaire complémentant *en trans* la fonction E1 essentielle à la réPLICATION virale. A l'heure actuelle, la seule lignée de complémentation utilisable est la lignée de rein embryonnaire 293 (Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36, 59-72), qui résulte de l'intégration dans ses chromosomes, d'un fragment du génome de l'Ad5 comprenant notamment l'extrémité 5' du génome viral ; de sorte que la lignée 293 complémente les adénovirus défectifs pour la fonction E1. Les cellules 293 contiennent des séquences qui se trouvent aussi dans l'adénovirus recombinant défectif, comme l'ITR 5', la région d'encapsidation et la partie en 3' de la région E1B comportant des séquences codant pour les protéines précoces .
- La faisabilité du transfert de gènes en utilisant des adénovirus est maintenant établie. Mais, la question de leur innocuité reste posée. En effet, ils sont capables de transformer certaines lignées cellulaires en culture, ce qui reflète le pouvoir potentiellement oncogène de certains des produits d'expression du génome adénoviral, essentiellement de la région E1 et probablement E4, au moins pour certains sérotypes. De plus, la probabilité de recombinaison génétique entre un adénovirus défectif de l'art antérieur, notamment un adénovirus recombinant, et soit un adénovirus naturel ou sauvage (issu d'une contamination accidentelle ou d'une infection opportuniste d'un organisme hôte), soit un fragment de génome adénoviral intégré dans la lignée de complémentation 293 n'est pas négligeable. En effet, il suffit d'un événement de recombinaison pour restaurer la fonction E1 et générer un adénovirus recombinant non-défectif capable de se disséminer dans l'environnement. Il est aussi envisageable qu'un adénovirus naturel sauvage co-infectant la même cellule qu'un adénovirus défectif puisse complémenter ce dernier pour la fonction E1 provoquant une co-dissémination des deux virus. Enfin, certains types de cellules eucaryotes produisent des protéines présentant une activité E1A-like également susceptibles de complémenter partiellement les adénovirus défectifs qui les infectent.

Il est donc souhaitable de disposer de vecteurs adénoviraux performants présentant le minimum de risque, en vue de leur utilisation en thérapie génique pour corriger *in vivo*

des défauts génétiques graves et traiter certaines maladies pour lesquelles on ne dispose pas d'approches thérapeutiques efficaces. C'est de leur obtention que dépend le succès de la thérapie génique appliquée à l'homme.

5 De plus, il existe des interrogations à propos de l'obtention de la lignée 293. Ces interrogations peuvent être de nature à compromettre l'acceptabilité des produits destinés à un usage humain qui en seront dérivés. Il serait utile de disposer de lignées de complémentation dont l'origine et l'histoire sont exactement connues pour produire des particules d'adénovirus recombinants destinées à un usage humain.

10 On a maintenant trouvé (1) de nouveaux vecteurs adénoviraux défectifs délétés de certaines régions spécifiques du génome adénoviral et plus adaptés au transfert d'une séquence nucléotidique exogène *in vivo* et (2) de nouvelles lignées de complémentation caractérisées, acceptables d'un point de vue pharmaceutique et donc offrant toutes les 15 caractéristiques de sécurité requises pour la production de produits destinés à un usage humain.

L'intérêt de ces nouveaux vecteurs est qu'ils présentent une capacité de clonage accrue permettant l'insertion d'un ou plusieurs gènes d'intérêt de grande taille et une sécurité 20 d'emploi maximale. Ces mutations délétères rendent ces adénovirus incapables de réPLICATION autonome et de transformation cellulaire et ceci sans altérer leur capacité à transférer et exprimer un gène d'intérêt.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur adénoviral défectif pour la 25 réPLICATION, capable d'être encapsidé dans une cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus comprenant de 5' en 3', un ITR 5', une région d'encapsidation, une région E1A, une région E1B, une région E2, une région E3, une région E4 et un ITR 3', par délétion :

30 (i) de tout ou partie de la région E1A, et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces ; ou

(ii) de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins une région sélectionnée parmi les régions E2 et E4 ; ou

35 (iii) de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.

- Au sens de la présente invention, l'expression "délétion" ou "dépourvu" se réfère à la suppression d'au moins un nucléotide dans la région ciblée et bien entendu il peut s'agir d'une délétion continue ou discontinue. Par tout ou partie, on entend soit l'intégralité soit une partie seulement de la région considérée. On préfère les délétions qui empêche la
- 5 production d'au moins un produit d'expression codé par ladite région. Elles peuvent donc se situer dans une région codante ou dans une région régulatrice comme la région promotrice et concerner au moins un nucléotide de manière à détruire le cadre de lecture d'un gène ou rendre une région promotrice non-fonctionnelle. Il peut également s'agir de délétions partielles d'un ou plusieurs gènes de ladite région ou de l'ensemble de la région.
- 10 Un vecteur adénoviral selon l'invention est défectif pour la replication mais capable d'être repliqué et encapsidé dans une cellule de complémentation lui fournissant *en trans* le ou les produit(s) pour lesquels il est défectif afin de générer une particule adénovirale (encore désignée adénovirus défectif) incapable de réPLICATION autonome dans une cellule
- 15 hôte mais néanmoins infectieuse car ayant la capacité de délivrer le vecteur dans une cellule hôte.
- Selon une première variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion de tout ou partie de la région E1A et de
- 20 la partie de la région E1B comprenant l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces. Selon un mode préféré, elle concerne le promoteur et les séquences codant pour les produits d'expression de la région E1B c'est à dire les protéines précoces et n'inclut pas tout ou partie du signal de terminaison de la transcription qui recouvre les séquences codant pour la protéine tardive IX. S'agissant d'un vecteur adénoviral selon
- 25 l'invention dérivant d'un adénovirus humain de type 5, ladite délétion comprend au moins les séquences comprises entre les nucléotides 1634 et 3509 du génome adénoviral dont la séquence est telle que divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260. Cette délétion a pour but de réduire ou supprimer les séquences communes entre un vecteur adénoviral selon l'invention et le fragment de génome adénoviral intégré
- 30 dans une lignée de complémentation, par exemple la lignée 293. De plus, elle élimine d'un vecteur adénoviral selon l'invention des séquences dont les produits d'expression sont potentiellement oncogènes, du moins en conjonction avec les produits d'expression de la région E1A.
- 35 Par ailleurs, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive en outre du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion de tout ou partie :
- de la région E3 et/ou

- de la région E2 et/ou
- de la région E4.

Il va de soi qu'un vecteur adénoviral selon l'invention peut comporter une des trois délétions ci-dessus énoncées ou deux d'entre elles selon n'importe quelles combinaisons ou encore l'ensemble des délétions.

Selon un mode particulièrement avantageux, un vecteur adénoviral selon l'invention est déleté d'une partie seulement de la région E3 et préférentiellement de la partie qui ne comprend pas les séquences codant pour la protéine gp19kDa. La présence de la séquence codant pour la protéine gp19kDa dans un vecteur adénoviral selon l'invention, permettra aux cellules infectées d'échapper à l'immunosurveillance de l'hôte ; un critère important lorsque le protocole thérapeutique nécessite plusieurs administrations répétées. On choisira, de préférence, de placer les séquences codant pour la gp19kDa sous le contrôle d'éléments appropriés permettant leur expression dans la cellule hôte, à savoir les éléments nécessaires à la transcription désdites séquences en ARNm et la traduction de ce dernier en protéine. Ces éléments comprennent en particulier un promoteur. De tels promoteurs sont bien connus de l'homme de l'art et sont insérés en amont de ladite séquence codante par les techniques conventionnelles du génie génétique. Le promoteur retenu sera, de préférence, un promoteur constitutif non activable par un des produits d'expression de la région E1A. A titre d'exemples, on peut citer le promoteur du gène HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl coenzyme A réductase), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), le LTR (Long Terminal Repeat) du RSV (Rous Sarcoma Virus) ou le promoteur d'un gène PGK (phospho-glycerate kinase) d'eucaryote supérieur.

Par ailleurs, un vecteur adénoviral selon l'invention, peut, de façon optionnelle, être déleté de la partie de la région E3 correspondant à la région promotrice, laquelle sera substituée par une région promotrice hétérologue, telles l'une de celles mentionnées ci-dessus.

Selon une deuxième variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion continue ou discontinue de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins la région E2 et/ou E4. Une telle délétion permet d'accroître les possibilités de clonage de gènes d'intérêt. D'autre part, éliminer tout ou partie de la région E4 permet également de réduire ou supprimer des séquences codant pour des produits potentiellement oncogènes.

Comme précédemment, un vecteur adénoviral selon l'invention peut, en outre être dépourvu de tout ou partie des régions E1B et/ou E3 et, en particulier, selon un mode de réalisation tel que mentionné précédemment (comme la délétion de la partie de la région E1B comprenant l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces et de la partie de la région E3 ne codant pas pour la protéine gp19kDa).

Enfin selon une troisième variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.

Une délétion partielle de la région d'encapsidation permet de réduire notamment la probabilité de dissémination incontrôlée d'un vecteur adénoviral selon l'invention, lorsque ce dernier est en présence d'un adénovirus sauvage. Une telle délétion permet d'affecter ses fonctions d'encapsidation de telle sorte que même en cas de complémentation *en trans* de la fonction défective de celui-ci par un adénovirus sauvage, il ne pourra être encapsidé efficacement par rapport au génome de l'adénovirus sauvage compétiteur.

Les délétions de la région d'encapsidation sera choisies en fonction de 2 critères : une capacité réduite à être encapsidé mais simultanément une efficacité résiduelle compatible avec une production industrielle. En d'autres termes, la fonction d'encapsidation d'un vecteur adénoviral selon l'invention est substantiellement maintenue quoique à un degré moindre. L'atténuation peut être déterminée par les techniques conventionnelles de titrage par infection d'une lignée adéquate et évaluation du nombre de plages de lyse. De telles techniques sont connues de l'homme de l'art. Dans le cadre de l'invention, l'efficacité d'encapsidation est réduite d'un facteur 2 à 50, avantageusement 3 à 20 et de préférence 5 à 10 par rapport à un adénovirus témoin ayant une région d'encapsidation de type sauvage.

Bien entendu, un vecteur adénoviral atténué selon l'invention, peut en outre comprendre au moins une ou une quelconque combinaison des délétions précédemment citées.

Un vecteur adénoviral selon la présente invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage, avantageusement d'un adénovirus canin, aviaire ou humain, de préférence d'un adénovirus humain de type 2, 3, 4, 5 ou 7 et, de manière tout à fait préférée, d'un adénovirus humain de type 5 (Ad5). Dans ce dernier cas, les délétions du vecteur adénoviral selon l'invention sont indiquées par référence à la position des nucléotides du génome de l'Ad5 spécifiée dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260.

On préfère tout particulièrement un vecteur adénoviral selon l'invention dérivant du génome d'un adénovirus humain de type 5, par délétion :

- 5 (i) de l'intégralité de la partie codant pour les protéines précoces de la région E1B et s'étendant du nucléotide 1634 et se terminant au nucléotide 4047 ; et/ou
- 10 (ii) de la région E4 s'étendant des nucléotides 32800 à 35826 ; et/ou
- 15 (iii) de la partie de la région E3 s'étendant des nucléotides 27871 à 30748 ; et/ou
- 20 (iv) de la partie de la région d'encapsidation :
 - allant du nucléotide 270 au nucléotide 346, ou
 - allant du nucléotide 184 au nucléotide 273, ou
 - allant du nucléotide 287 au nucléotide 358.

De préférence, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus sauvage ou naturel par délétion d'au moins 18 % dudit génome, d'au moins 22 %, d'au moins 25 %, d'au moins 30 %, d'au moins 40 %, d'au moins 50 %, d'au moins 60 %, d'au moins 70 %, d'au moins 80 %, d'au moins 90 % ou encore d'au moins 95 % et notamment de 98,5%.

Selon un mode particulièrement préféré, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus par délétion de l'ensemble du génome adénoviral à l'exclusion des ITRs 5' et 3' et de tout ou partie de la région d'encapsidation. Selon cette variante, il ne comprend que le minimum de séquences virales afin de limiter les risques de recombinaison, les risques d'oncogénécité et avoir une capacité de clonage maximale. On parlera alors d'un vecteur adénoviral "minimum" dans lequel il sera alors possible d'insérer jusqu'à 30kb de séquence nucléotidique exogène. Un vecteur adénoviral préféré selon l'invention dérive d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie du génome viral s'étendant des nucléotides 459 à 35832.

Dans le cadre de la présente invention, un vecteur adénoviral selon l'invention a pour objet le transfert et l'expression d'une séquence nucléotidique exogène dans une cellule hôte. Par "séquence nucléotidique exogène", on entend un acide nucléique qui comprend des séquences codantes et des séquences régulatrices permettant l'expression desdites séquences codantes et dans lequel les séquences codantes sont des séquences qui ne sont normalement pas présentes dans le génome d'un adénovirus. Les séquences régulatrices peuvent être d'origine quelconque. La séquence nucléotidique exogène est introduite dans un vecteur adénoviral selon l'invention par les techniques classiques du génie génétique, entre la région d'encapsidation et l'ITR 3'.

Une séquence nucléotidique exogène peut être constituée d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt et, de manière préférée, d'intérêt thérapeutique. Dans le cadre de la présente invention, un gène d'intérêt peut coder soit pour un ARN anti-sens, soit pour un ARNm qui sera ensuite traduit en protéine d'intérêt. Un gène d'intérêt peut être de type génomique, de type ADN complémentaire (ADNc) ou de type mixte (minigène, dans lequel au moins un intron est déleté). Il peut coder pour une protéine mature, un précurseur d'une protéine mature, notamment un précurseur destiné à être secrété et comprenant de ce fait un peptide signal, une protéine chimérique provenant de la fusion de séquence d'origine diverse ou un mutant d'une protéine naturelle présentant des propriétés biologiques améliorées ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotide(s) du gène codant pour la protéine naturelle.

Un gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle d'éléments appropriés à son expression dans une cellule hôte. Par "éléments appropriés", on entend l'ensemble des éléments nécessaires à sa transcription en ARN (ARN anti-sens ou ARNm) et à la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi les éléments nécessaires à la transcription, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur régulable et il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou virale et même adénovirale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène d'intérêt en question. D'une façon générale, un promoteur en usage dans la présente invention, peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices. A titre d'exemples, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, est placé sous le contrôle du promoteur des gènes d'immunoglobuline lorsque l'on cherche à cibler son transfert dans des cellules hôtes lymphocytaires. On peut également citer le promoteur du gène TK-HSV-1 (thymidine kinase du virus de l'herpès de type 1) ou encore le promoteur adénoviral MLP, notamment de l'adénovirus humain de type 2, permettant une expression dans un grand nombre de types cellulaires.

Parmi les gènes d'intérêt utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- les gènes codant pour des cytokines, comme l'interféron alpha, l'interféron gamma, les interleukines ;
- les gènes codant pour des récepteurs membranaires, comme les récepteurs reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites), de préférence par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficiency Humain) ;
- les gènes codant pour des facteurs de coagulation, comme le facteur VIII et le facteur IX ;
- le gène codant pour la dystrophine ;
- le gène codant pour l'insuline ;
- les gènes codant pour des protéines participant directement ou indirectement aux canaux ioniques cellulaires, comme la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ;
- les gènes codant pour des ARN anti-sens ou des protéines capables d'inhiber l'activité d'une protéine produite par un gène pathogène, présent dans le génome d'un organisme pathogène, ou par un gène cellulaire, dont l'expression est dérégulée, par exemple un oncogène ;
- les gènes codant pour une protéine inhibant une activité enzymatique, comme l' α -1- antitrypsine ou un inhibiteur d'une protéase virale ;
- les gènes codant pour des variants de protéines pathogènes qui ont été mutées de façon à altérer leur fonction biologique, comme par exemple des variants trans-dominants de la protéine TAT du virus VIH capables de compétition avec la protéine naturelle pour la liaison à la séquence cible, empêchant ainsi l'activation du VIH ;
- les gènes codant pour des épitopes antigéniques afin d'accroître l'immunité de la cellule hôte ;

- les gènes codant pour les protéines de complexe majeur d'histocompatibilité des classes I et II, ainsi que les gènes codant pour les protéines inductrices de ces gènes ;
- 5 les gènes codant pour des enzymes cellulaires ou produites par des organismes pathogènes ; et
- 10 les gènes suicides. On peut citer plus particulièrement le gène suicide TK-HSV-1. L'enzyme TK virale présente une affinité nettement supérieure par rapport à l'enzyme TK cellulaire pour certains analogues de nucléosides (comme l'acyclovir ou le gancyclovir). Elle les convertit en molécules monophosphatées, elles-mêmes convertibles, par les enzymes cellulaires, en précurseurs de nucléotides, qui sont toxiques. Ces analogues de nucléotides sont incorporables dans les molécules d'ADN en voie de synthèse, donc principalement dans l'ADN des cellules en état de réplication. Cette incorporation permet de détruire spécifiquement les cellules en division comme les cellules cancéreuses.

15 Cette liste n'est pas limitative et d'autres gènes d'intérêt peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

Par ailleurs, selon un autre mode de mise en oeuvre de l'invention, un vecteur adénoviral selon l'invention peut en outre comprendre un gène non-thérapeutique codant pour une protéine trans-activatrice de la transcription non-adénovirale. Bien entendu, on évitera le 25 ou les gène(s) de la région E1A codant pour une protéine trans-activatrice, dont l'expression risquerait de rendre l'adénovirus non-défectif. On choisira, de préférence, le gène codant pour la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Son expression permettra la propagation du vecteur dans une lignée de complémentation telle que celle décrite ci-après. Une telle lignée est plus sophistiquée et permet de pallier à d'éventuels 30 problèmes de toxicité due à la production en continue des protéines adénovirales de complémentation. Le gène codant pour une protéine trans-activatrice de la transcription peut être placé, si nécessaire, sous le contrôle d'éléments appropriés à son expression ; par exemple ceux qui permettent l'expression d'un gène d'intérêt.

35 L'invention a également trait à une particule adénovirale ainsi qu'à une cellule eucaryote hôte comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention. Ladite cellule est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine et peut

comprendre ledit vecteur sous forme intégrée dans le génome ou, de préférence, sous forme non-intégrée (épisome).

Une particule adénovirale selon l'invention peut être préparée par passage dans toute lignée de complémentation fourni*ant* les fonctions pour lesquelles un vecteur adénoviral selon l'invention est défectif, par exemple la lignée 293 de l'art antérieur. Ces techniques de préparation sont connues de l'homme de l'art (Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol 7, 109-128, Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc.). D'une manière optionnelle, une particule adénovirale selon l'invention peut être générée dans une lignée de complémentation selon l'invention telle que décrite ci-après.

C'est pourquoi la présente invention concerne également une lignée de complémentation comportant un élément de complémentation, comprenant notamment une partie de la région E1 du génome d'un adénovirus à l'exclusion de l'ITR 5' ; ledit élément de complémentation étant capable de complémer *en trans* un vecteur adénoviral défectif et étant intégré dans le génome de ladite lignée de complémentation ou inséré dans un vecteur d'expression.

Dans le cadre de la présente invention, le terme "lignée de complémentation" se réfère à une cellule eucaryote capable de fournir *en trans* la ou les fonction(s) pour la(les)quelle(s) un vecteur adénoviral est défectif. En d'autres termes, elle est capable de produire l'une ou les protéine(s) nécessaire(s) à la replication et à l'encapsidation dudit vecteur adénoviral, protéines précoces et/ou tardives qu'il ne peut lui-même produire et qui sont nécessaires à la constitution d'une particule virale. Bien entendu, ladite partie peut être modifiée par mutation, délétion et/ou addition de nucléotides, du moment que ces modifications n'altèrent pas sa capacité de complémentation. Ainsi, un vecteur adénoviral défectif pour la fonction E1 devra être propagé dans une lignée de complémentation pour E1 (capable de fournir *en trans* la ou l'ensemble des protéines codées par la région E1 que le vecteur ne peut produire), un vecteur défectif pour les fonctions E1 et E4 le sera dans une lignée de complémentation pour E1 et E4 (fournissant les protéines nécessaires codées par les régions E1 et E4) et, enfin, un vecteur défectif pour les fonctions E1, E2 et E4 le sera dans une lignée de complémentation pour les trois fonctions. Comme indiqué dans l'introduction, la région E3 est non essentielle, et ne nécessite pas d'être spécifiquement complétée.

Une lignée de complémentation selon l'invention peut être dérivée soit d'une lignée cellulaire immortalisée, capable de se diviser indéfiniment, soit d'une lignée primaire. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, une lignée de

14

complémentation selon l'invention est utile pour l'encapsulation de n'importe quel vecteur adénoviral défectif et, en particulier, d'un vecteur adénoviral défectif selon l'invention. Ainsi, lorsqu'on utilisera ci-après le terme "vecteur adénoviral défectif", il doit être entendu qu'il fait référence à un vecteur défectif quelconque, de l'art antérieur ou de la 5 présente invention.

Par "élément de complémentation", on entend un acide nucléique comprenant au moins la partie du génome adénoviral en usage dans le cadre de la présente invention. Il peut être inséré sur un vecteur, par exemple de type plasmidique ou viral, par exemple 10 rétroviral, adénoviral ou dérivé d'un poxvirus. On préférera néanmoins le cas où il est intégré dans le génome d'une lignée de complémentation selon l'invention. Les méthodes pour introduire un vecteur ou un acide nucléique dans une lignée cellulaire et éventuellement l'intégrer dans le génome d'une cellule constituent des techniques conventionnelles bien connues de l'homme de l'art, de même que les vecteurs utilisables à 15 de telles fins. L'élément de complémentation peut être introduit dans une lignée de complémentation selon l'invention, de façon préalable ou concomitante à un vecteur adénoviral défectif.

Selon un mode de réalisation spécifique, une lignée de complémentation selon l'invention 20 est destinée à complémer *en trans* un vecteur adénoviral défectif pour la fonction E1. Une telle lignée présente l'avantage de diminuer les risques de recombinaison puisque, contrairement à la lignée conventionnelle 293, elle est dépourvue de l'ITR 5' présent dans les vecteurs.

25 Dans le cadre de la présente invention, une lignée de complémentation selon l'invention peut comprendre tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus et :

- (i) tout ou partie d'au moins une région du génome adénoviral sélectionnée parmi les régions E1B, E2 et E4, ou
 - 30 (ii) tout ou partie d'au moins deux des régions E1B, E2 et E4 dudit génome, ou
 - (iii) tout ou partie des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.
- 35 Dans le cadre de l'invention, lesdites régions peuvent être placées, si nécessaire, sous le contrôle d'éléments appropriés permettant leur expression, mais, on préfère les placer sous le contrôle de leur propre promoteur, inductible par la protéine trans-activatrice de transcription codée par la région E1A.

A titre indicatif, une lignée de complémentation selon la variante (ii) comprenant les régions E1A, E1B et E4 est destinée à la préparation d'un adénovirus défectif pour les fonctions E1 et E4 déléte de tout ou partie des régions correspondantes.

5

Selon un mode avantageux, une lignée de complémentation selon l'invention, comprend notamment tout ou partie de la région E1A et l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1B.

- 10 Par ailleurs, selon une variante de ce mode de réalisation, une lignée de complémentation selon l'invention peut, en outre, être dépourvue de la région promotrice de la région E1A. Dans ce cas, la partie du génome adénoviral codant pour les protéines précoces de ladite région E1A sera placée sous le contrôle d'un promoteur hétérologue approprié et fonctionnel dans ladite lignée de complémentation. Il peut être isolé de n'importe quel gène eucaryote ou viral. On évitera, cependant, d'avoir recours à un promoteur adénoviral d'une région précoce. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif. A titre d'exemples, on peut citer les promoteurs du virus SV40, du gène TK-HSV-1 et du gène murin PGK.
- 20 D'une manière alternative, le promoteur retenu peut être régulable et avantageusement, inductible par une protéine trans-activatrice de transcription non adénovirale. Il peut s'agir d'un promoteur isolé d'un gène naturellement inductible ou d'un promoteur quelconque modifié par l'addition de séquences d'activation (ou UAS, pour Upstream Activating Sequence en anglais) répondant à ladite protéine trans-activatrice. De manière 25 plus particulière, on préfère utiliser un promoteur inductible par la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* et, de préférence, un promoteur hybride constitué d'un promoteur dit "minimum" contenant uniquement les séquences d'initiation de la transcription (TATA box et site d'initiation) d'un gène quelconque (par exemple du gène TK-HSV-1 ou MLP d'Ad2), en amont duquel on a inséré au moins une séquence 30 d'activation du gène Gal10 de *Saccharomyces cerevisiae* (Webster et al., 1988, Cell, 52, 169-178). Cette dernière peut être synthétisée chimiquement ou isolée du gène Gal10, selon les techniques classiques du génie génétique. Ainsi, le promoteur hybride ne sera activé et n'induira l'expression des gènes codés par la région E1A placés sous son contrôle, qu'en présence de la protéine Gal4. Puis, les produits d'expression de la région 35 E1A pourront à leur tour, induire l'expression des autres régions précoces E1B, E2 et/ou E4 éventuellement comprises dans une lignée de complémentation selon l'invention. Ce mode de réalisation particulier de l'invention, évite la production d'une manière constitutive (éventuellement toxique) des protéines adénovirales nécessaires à la

complémentation. Ainsi, l'induction peut être déclenchée en présence d'un vecteur adénoviral défectif selon l'invention exprimant la protéine Gal4. Cependant une telle lignée peut également être utilisée pour préparer n'importe quel vecteur adénoviral défectif, à la condition toutefois de fournir *en trans* la protéine Gal4. Les moyens de 5 fournir *en trans* une protéine sont connus de l'homme du métier.

D'une manière générale, une lignée de complémentation comprend une partie du génome d'un adénovirus qui dérive avantageusement d'un adénovirus animal, comme un adénovirus canin ou aviaire ou, de préférence, d'un adénovirus humain et, tout 10 particulièrement, du type 2 ou 5.

Une lignée de complémentation selon l'invention comprend notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant :

- 15 (i) du nucléotide 100 au nucléotide 5297 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260, ou
- (ii) du nucléotide 100 au nucléotide 4034, ou
- 20 (iii) du nucléotide 505 au nucléotide 4034.

Avantageusement, la partie du génome selon (ii) est insérée en amont d'un signal de terminaison de la transcription, comme par exemple le signal de polyadénylation du virus SV40 (Simian Virus 40) ou du gène β-globine de lapin. Alors que la partie selon (iii) qui 25 ne comprend ni les séquences promotrices de la région E1A, ni le signal de terminaison de la transcription de la région E1B est placée sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment d'un promoteur inductible par la protéine Gal4, et d'un signal de terminaison de la transcription, par exemple celui du gène β-globine de lapin. Une telle lignée de complémentation est considérée comme particulièrement sûre car dépourvue de 30 la majorité des séquences communes avec un adénovirus défectif.

D'autre part, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter la partie de la région E4 d'un adénovirus humain de type 5 allant du nucléotide 32800 et se terminant au nucléotide 35826 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée 35 Genebank sous la référence M73260.

Par ailleurs, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter l'ensemble du génome d'un adénovirus naturel, à l'exception de la région d'encapsidation et des ITRs

- 5' et 3' et, de manière tout à fait préférée, la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 allant du nucléotide 505 et se terminant au nucléotide 35826 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260. Aux fins de la présente invention, celle-ci est placée sous le contrôle d'un promoteur approprié.
- 5 On aura, de préférence, recours à un promoteur inductible par la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Une telle lignée permettra de complémenter *en trans* l'ensemble des fonctions essentielles à la replication et l'encapsidation d'un vecteur adénoviral défectif pour les fonctions E1, E2 et E4, notamment d'un vecteur adénoviral minimum selon l'invention.
- 10 Selon un mode préféré, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter un élément de complémentation comprenant, en outre, un gène codant pour un marqueur de sélection permettant la détection et l'isolement des cellules le comportant. Dans le contexte de la présente invention, il peut s'agir de n'importe quel gène codant pour un marqueur de sélection, ceux-ci étant généralement connus de l'homme de l'art, avantageusement d'un gène de résistance à un antibiotique et, de préférence, du gène codant pour la puromycine acetyl-transférase (gène pac) conférant la résistance à la puromycine.
- 15
- 20 Dans le cadre de la présente invention, le gène codant pour un marqueur de sélection peut être placé sous le contrôle des éléments appropriés permettant son expression. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif, comme le promoteur précoce du virus SV40. Cependant, on préférera un promoteur inductible par la protéine trans-activatrice codée par la région E1A, en particulier le promoteur adénoviral E2A. Une telle combinaison introduira une pression de sélection pour maintenir l'expression des gènes de la région E1A dans une lignée de complémentation selon l'invention. Aux fins de la présente invention, le promoteur retenu peut être modifié par délétion, mutation, substitution et/ou addition de nucléotides.
- 25
- 30 Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, une lignée de complémentation selon l'invention est dérivée d'une lignée cellulaire acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Par "lignée cellulaire acceptable d'un point de vue pharmaceutique", on entend une lignée cellulaire caractérisée (dont on connaît l'origine et l'histoire) et/ou ayant déjà été utilisée pour la production à grande échelle de produits destinés à un usage
- 35 humain (constitution de lots pour des essais cliniques avancés ou de lots destinés à la vente). De telles lignées sont disponibles dans des organismes tels que l'ATCC. A cet égard, on peut mentionner les lignées de rein de singe vert d'Afrique Vero, de rein de hamster doré ou syrien BHK, humaine dérivée d'un carcinome de poumon A549,

humaine pulmonaire MRC5, humaine pulmonaire W138 et d'ovaire de hamster chinois CHO.

D'une manière alternative, une lignée de complémentation selon l'invention peut dériver 5 de cellules primaires et notamment de cellules de rétine prélevées d'un embryon humain.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule adénovirale selon l'invention, selon lequel :

10 - on introduit un vecteur adénoviral selon l'invention dans une lignée de complémentation capable de complémenter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une lignée de complémentation transfectée,

15 - on cultive ladite lignée de complémentation selon des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule adénovirale, et

- on récupère ladite particule dans la culture cellulaire.

20 Bien entendu, la particule adénovirale peut être récupérée du surnageant de culture mais, également des cellules selon les protocoles conventionnels.

D'une manière préférée, un procédé selon l'invention met en oeuvre une lignée de complémentation selon l'invention.

25 L'invention a également pour objet l'usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral, d'une particule d'adénovirus, d'une cellule eucaryote hôte ou d'une lignée de complémentation selon l'invention.

30 La présente invention est enfin relative à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur adénoviral, une particule d'adénovirus, une cellule eucaryote ou une cellule de complémentation selon l'invention, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

35 La composition selon l'invention, est en particulier destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que :

- des maladies génétiques, comme l'hémophilie, la mucoviscidose ou la myopathie, celle de Duchêne et de Becker,
 - des cancers, comme ceux induits par des oncogènes ou des virus,
- 5
- des maladies rétrovirales, comme le SIDA (syndrome de l'immunodéficiency acquise résultant de l'infection par le VIH), et
 - des maladies virales récurrentes, comme les infections virales provoquées
- 10
- par le virus de l'herpès.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent thérapeutique ou prophylactique à un support tel qu'un diluant. Une composition 15 selon l'invention peut être administrée par aérosol ou par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine de l'art, en particulier par voie orale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale intrapulmonaire ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés 20 varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. D'une manière générale, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend une dose d'adénovirus selon l'invention comprise entre 10^4 et 10^{14} , avantageusement 10^5 et 10^{13} et de préférence 10^6 et 10^{11} . Une composition pharmaceutique, en particulier à visée 25 prophylactique, peut comprendre en outre un adjuvant acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur adénoviral, d'une particule 30 adénovirale, d'une cellule eucaryote ou d'une lignée de complémentation selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

La présente invention est plus complètement décrite en référence aux Figures suivantes et à l'aide des exemples suivants.

35

La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100), indiquant l'emplacement des différents gènes.

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG6546.

La Figure 3 est une représentation schématique du vecteur pTG6581.

5

La Figure 4 est une représentation schématique du vecteur pTG6303.

La Figure 5 est une représentation schématique des vecteurs pTG1660 et pTG1661.

10 La Figure 6 est une représentation schématique des vecteurs pTG1653, pTG1654 et pTG1655.

La Figure 7 est une représentation schématique du vecteur pTG5913.

15 La Figure 8 est une représentation schématique du vecteur pTG8512.

La Figure 9 est une représentation schématique du vecteur pTG8513.

La Figure 10 est une représentation schématique du vecteur pTG8514.

20

La Figure 11 est une représentation schématique du vecteur pTG8515.

EXEMPLES

25 Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

30 L'ensemble des étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens est réalisé par passage dans la souche *Escherichia coli* (*E. coli*) 5K ou BJ, alors que celles qui mettent en oeuvre des vecteurs dérivés du phage M13 sont réalisées par passage dans *E. coli* NM 522. En ce qui concerne les étapes d'amplification par PCR, on applique le protocole tel que décrit dans PCR Protocols-A guide to methods and applications, 35 (1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press Inc.).

D'autre part, les cellules sont transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer la technique au phosphate de calcium (Maniatis et al.,

supra). Mais d'autres protocoles permettant d'introduire un acide nucléique dans une cellule peuvent également être employés, tels que la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection d'une cellule sélectionnée ou les méthodes basées sur l'emploi de liposomes.

5

Les fragments insérés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique :

- 10 - du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260,
- 15 - du génome de l'adénovirus de type 2 (Ad2), telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence J01949,
- 20 - du génome du virus SV40 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence J02400.

EXEMPLE 1 : Génération d'un adénovirus "atténué" comprenant une délétion d'une partie de la région d'encapsidation.

20

1. Construction d'un vecteur "atténué" comprenant une délétion du nucléotide 184 au nucléotide 273 de la région d'encapsidation

25

- On construit un vecteur comprenant
- 25 - l'ITR 5' du génome de l'Ad5 (du nucléotide 1 au nucléotide 103),
- 30 - la région d'encapsidation de l'Ad5 comprise entre les nucléotides 104 à 458 dans laquelle la portion allant du nucléotide 184 au nucléotide 273 est déletée et la thymine (T) en position 176 est modifiée en une cytosine (C) afin de créer un site de restriction *Aat*II,
- 35 - une cassette d'expression d'un gène d'intérêt comprenant de 5' vers 3' le MLP de l'Ad2 (nucléotides 5779 à 6038), les sites de restriction *Kpn*I-*Xba*I-*Hind*III et *Bam*HI, l'ADNC humain codant pour la protéine CFTR, (la composition en acides aminés correspond à la séquence publiée par Riordan et al, 1989, Science, 245, 1066-1073 ; à l'exception d'une valine à la place de la méthionine en position 470),

les sites *PstI*, *XbaI* et *SalI* et enfin le signal de terminaison de la transcription du virus SV40 (nucléotides 2665 à 2538), et

- le fragment du génome de l'Ad5 s'étendant du nucléotide 3329 au nucléotide 6241.

5

Dans un premier temps, on clone entre les sites *EcoRI* et *EcoRV* du vecteur M13TG131 (Kieny et al., 1983, Gene, 26, 91-99) le fragment *EcoRI-SmaI* isolé de pMLP11. Cette construction est issue de pMLP10 (Levrero et al., 1991, Gene, 101, 195-202) et diffère du vecteur parental par l'introduction d'un site *SmaI* au niveau du site *HindIII*. On obtient le vecteur M13TG6501. Celui-ci est soumis à une mutagénèse dirigée afin de déléter les séquences comprises entre les nucléotides 184 à 273 de la région d'encapsidation. La mutagénèse dirigée est réalisée à l'aide d'un kit commercial (Amersham) selon les recommandations du fournisseur, et met en oeuvre l'oligonucléotide OTG4174 reporté dans l'identificateur de séquence n°1 (SEQ ID NO: 1). Le vecteur muté est désigné M13TG6502. La région d'encapsidation ainsi déletée est réintroduite sous forme d'un fragment *EcoRI-BglII*, le site *BglII* étant rendu franc par traitement à l'ADN polymérase Klenow, dans le vecteur pMLP11 digéré par *EcoRI* et *SmaI*.

20 Le vecteur obtenu, pTG6500, est digéré partiellement par *PstI*, traité à l'ADN polymérase du phage T4 puis digéré par *PvuI*. On insère dans ce vecteur le fragment *PvuI-HpaI* isolé de pTG5955 (dérivé de pMLP11). Ce fragment comporte le signal de terminaison de la transcription du virus SV40 et la partie du génome de l'Ad5 s'étendant du nucléotide 3329 au nucléotide 6241. Le vecteur pTG6505 ainsi généré est digéré partiellement par *SphI*, traité à l'ADN polymérase du phage T4 et religué, ceci afin de détruire le site *SphI* situé en 5' du polylinker. Il résulte le pTG6511, dans lequel on clone, après digestion par *BamHI* et traitement à l'ADN polymérase Klenow, l'ADNc CFTR humain sous forme d'un fragment aux extrémités franches généré par digestion *XbaI* et *AvaI* et traitement à l'ADN polymérase Klenow. On obtient pTG6525. A titre indicatif, l'ADNc CFTR est isolé d'un plasmide de l'art antérieur, tel que pTG5960 (Dalemans et al., 1991, Nature, 354, 526-528).

35

2. Construction d'un vecteur "atténué" comprenant une délétion du nucléotide 270 au nucléotide 346 de la région d'encapsidation.

Le vecteur M13TG6501 est soumis à une mutagénèse dirigée mettant en oeuvre l'oligonucléotide OTG4173 (SEQ ID NO: 2). Puis le fragment muté est réintroduit dans pMLP11, comme indiqué précédemment, pour générer le vecteur pTG6501. Ce dernier

est digéré par *SphI*, traité à l'ADN polymérase du phage T4, puis par *PvuI*. On obtient pTG6546 (Figure 2) par clonage du fragment *PvuI-KpnI* (le site *KpnI* ayant été rendu franc) isolé de pTG6525 et comportant l'ADNc CFTR humain.

5 3. Construction d'un vecteur "atténué" comprenant une délétion du nucléotide 287 au nucléotide 358 de la région d'encapsulation.

Le vecteur M13TG6501 est soumis à une mutagénèse dirigée afin de déléter les séquences comprises entre les nucléotides 287 et 358 de la région d'encapsulation et de 10 modifier les thymines en position 275 et 276 en guanines pour introduire un site *NcoI*. La mutagénèse est réalisée à l'aide de l'oligonucléotide OTG4191 (SEQ ID NO: 3) pour donner M13TG6507. Ce dernier est clivé par *BglII*, traité à l'ADN polymérase Klenow puis digéré par *EcoRI* et on purifie le fragment correspondant muté que l'on introduit dans pMLP11 digéré par *EcoRI* et *SmaI*. On génère pTG6504, duquel on isole le 15 fragment *SphI* (site rendu franc par traitement à l'ADN polymérase du phage T4)-*PvuI* que l'on insère entre les sites *KpnI* (rendu franc par traitement à la T4 polymérase) et *PvuI* de pTG6511. On obtient pTG6513 qui est traité par *BamHI* et l'ADN polymérase Klenow avant d'insérer le fragment *AvaI* et *XhoI* de pTG5960 pour donner pTG6526.

20 4. Génération d'un adénovirus recombinant défectif et atténué.

Les adénovirus défectifs recombinants sont générés par co-transfection dans les cellules 293 de soit pTG6525, pTG6526 ou pTG6546 linéarisé par *ClaI* et d'ADN génomique de l'Ad-dl324 (Thimmappaya et al., 1982, Cell, 31, 543-551) également digéré par *ClaI*, de manière à générer un virus recombinant par recombinaison homologue. Après 8 à 10 jours, les plages individuelles sont isolées, amplifiées dans les cellules 293 et analysées par cartographie de restriction. Des stocks viraux (AdTG6525, AdTG6526 et AdTG6546) sont constitués et leur titre déterminé selon les techniques conventionnelles.

30 Le virus AdTG6546 est placé en situation de compétition par co-infection avec l'Ad-CFTR (Rosenfeld et al., 1992, Cell, 68, 143-155) qui comporte une région d'encapsulation de type sauvage. On infecte les cellules 293 par 5 ufp (unité formant des plages) d'Ad-CFTR et 5 ufp d'AdTG6546 par cellule. On isole en parallèle l'ADN viral total par la méthode de Hirt (Gluzman et Van Doren, 1983, J. Virol., 45, 91-103) et l'ADN viral encapsidé après traitement des cellules avec 0,2 % déoxydrolate puis avec 35 10 µg/ml de déoxyribonucléase (DNase) I, pour éliminer les ADN non protégés dans les virions. Alors que la quantité d'ADN total d'Ad-CFTR et d'AdTG6546 est identique, il y a environ 3 fois moins d'ADN d'AdTG6546 que d'ADN d'Ad-CFTR encapsidé.

On mesure le niveau d'expression de la protéine CFTR dans les extraits cellulaires de cellules 293 infectées par AdTG6546. L'analyse est effectuée par Western blot selon la technique décrite dans Dalemans et al. (1991, *Nature, supra*) en mettant en oeuvre l'anticorps monoclonal MATG1031. Mais, tout autre anticorps reconnaissant des épitopes antigéniques de la protéine CFTR peut être utilisé. On révèle un produit d'une masse moléculaire attendue d'environ 170 kDa. A titre indicatif, le niveau de production est à peu près équivalent à celui obtenu dans les extraits cellulaires infectés par le virus non atténué Ad-CFTR.

10

EXEMPLE 2 : Génération d'un adénovirus défectif délesté de la région E1A et de l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1B..

15

I. Obtention d'un adénovirus recombinant pour l'expression de la protéine CFTR
(AdTG6581)

Un tel adénovirus est généré à partir d'un vecteur plasmidique pTG6581 comprenant de 5' vers 3' :

20

- l'ITR 5' de l'Ad5 (des nucléotides 1 à 103),
- la région d'encapsidation de l'Ad5 (des nucléotides 104 à 458),
- une séquence nucléotidique exogène comportant une cassette d'expression, laquelle comprend les éléments suivants :
 - * le MLP de l'Ad2 (nucléotides 5779 à 6038), suivi des trois leaders tripartites également de l'Ad2 (nucléotides 6039-6079 ; nucléotides 7101-7175 ; nucléotides 9637-9712) ; ces leaders sont inclus afin d'augmenter l'efficacité de traduction des séquences insérées en aval,
 - * un polylinker comprenant de 5' vers 3' les sites de restrictions *Xba*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RV, *Hpa*I et *No*I utilisables pour le clonage d'un gène d'intérêt,
 - * un gène d'intérêt, comme le gène codant pour la protéine CFTR,
 - * le signal de terminaison de la transcription isolé du virus SV40 (nucléotides 2543 à 2618),

25

30

35

la portion du génome adénoviral de l'Ad5 allant des nucléotides 4047 à 6241.

Le fragment du génome de l'Ad5 s'étendant du nucléotide 4047 au nucléotide 4614 est
5 amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique d'Ad5. La réaction PCR met en oeuvre
l'amorce sens OTG5021 (SEQ ID NO: 4), comprenant en son extrémité 5' un site *Bam*H I
destiné à faciliter les étapes de clonage ultérieures, et l'amorce anti-sens OTG5157 (SEQ
ID NO: 5.) Le fragment ainsi généré est traité à l'ADN polymérase Klenow, avant d'être
10 cloné dans le site *Sma*I de M13mp18 (Gibco BRL), donnant lieu au M13TG6517. La
séquence du fragment généré par PCR est vérifiée selon la méthode enzymatique
classique (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463).

Par ailleurs, le fragment *Pvu*I-*Sma*I est isolé de pMLP11. Il est cloné entre les sites *Pvu*I
et *Kpn*I de pTG6511 (exemple 1.1), le site *Kpn*I ayant été rendu franc par un traitement
15 à l'ADN polymérase du phage T4 selon les méthodes standards. On génère ainsi le
vecteur pTG6547.

Ce dernier est digéré par les enzymes *Sal*I et *Bst*XI et ligué à deux fragments, d'une part
le fragment *Bam*H I-*Bst*XI purifié de M13TG6517 et, d'autre part, le fragment *Xho*I-
20 *Bgl*II de pTG6185. Ce dernier comprend notamment le signal de terminaison de la
transcription du virus SV40 encadré par les sites de restriction *Xho*I et *Bgl*II. Mais, tout
autre plasmide comportant la même séquence de terminaison et des sites de restriction
adéquates pourrait être utilisé. On obtient le vecteur pTG6555, dans lequel on insère
25 dans le site unique *Bam*H I un adaptateur contenant deux sites de restriction générant des
extrémités franches, *Eco*RV et *Hpa*I. Cet adaptateur provient de la réassociation des
oligonucléotides OTG5564 et OTG5565 (SEQ ID NO: 6 et 7). On obtient pTG6580.
Enfin, le fragment *Sac*I-*Pst*I de pTG6525 dont les extrémités ont été rendues franches et
comportant l'ADNc CFTR humain, est cloné dans le site *Eco*RV de pTG6580. On
génère pTG6581 (Figure 3).

30 L'adénovirus recombinant correspondant AdTG6581 est généré par co-transfection de
pTG6581 et Ad dl324 clivés par *Clal* dans une lignée de complémentation pour la
fonction E1, comme la lignée 293 ou une lignée de l'exemple 6, selon le protocole
classique.

35

2. Obtention d'un adénovirus recombinant pour l'expression de l'IFNy.

Le vecteur pTG6303 (Figure 4) est obtenu par clonage dans le site *HpaI* de pTG6580 du fragment *HpaI-SmaI* de M13TG2437. Ce dernier provient du clonage dans un vecteur M13TG130 (Kieny et al., 1983, *supra*) du gène codant pour l'interféron gamma (IFN γ) dont la séquence est telle que spécifiée dans Gray et al. (1982, *Nature*, 295, 503-508).

- 5 L'adénovirus recombinant AdTG6303 est obtenu selon les techniques classiques par recombinaison homologue résultant de la co-transfection de pTG6303 et de l'Ad dl324 linéarisé par *ClaI* dans une lignée de complémentation pour la fonction E1.

- 10 3. Construction d'un adénovirus déléte de la région E1 et dans lequel la région E3
est placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

Le vecteur pTG1670 est obtenu par clonage entre les sites *AaiII* et *BamHI* du vecteur p polyII (Lathe et al., 1987, *Gene* 57, 193-201), d'un fragment PCR comportant le LTR3' (Long Terminal Repeat) du virus RSV (Rous Sarcoma Virus). La réaction PCR met en oeuvre le vecteur pRSV/L (De Wet et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-737) à titre de matrice et les amores OTG5892 et OTG5893 (SEQ ID NO: 8 et 9).

Par ailleurs, la partie 5' de la région E3 (nucléotides 27588 à 28607) est amplifiée par PCR à partir du vecteur pTG1659 et à l'aide des amores OTG5920 et OTG5891 (SEQ ID NO: 10 et 11). Ce dernier est construit en plusieurs étapes. Le fragment *BamHI-AvrII* (nucléotides 21562 à 28752) est obtenu de l'ADN génomique d'Ad5 puis cloné entre les mêmes sites de pTG7457 pour générer pTG1649. Le vecteur pTG7457 est un pUC19 (Gibco BRL) modifié au niveau du polylinker de manière à contenir notamment un site *AvrII*. Puis on introduit le fragment *EcoRI* (Klenow)-*AvrII* de M13TG1646 (exemple 8) dans pTG1649 clivé par *AvrII-NdeI* (Klenow), ce qui donne le vecteur pTG1651. Enfin, pTG1659 est généré par l'insertion du fragment *AvrII* (nucléotides 28752 à 35463) purifié de l'ADN génomique d'Ad5 dans pTG1651 linéarisé par *AvrII*. Le fragment PCR est intégré entre les sites *XbaI* et *BamHI* et de p poly II, pour donner pTG1671. On insère ensuite dans le site *AaiII* de ce dernier, un fragment *EcoRV-AaiII* obtenu de pTG1670, pour donner pTG1676.

Le fragment *EcoRI* de l'Ad5 correspondant aux nucléotides 27331 à 30049, est isolé à partir d'une préparation d'ADN génomique et sous-cloné dans le pBluescript-Sk+ (Stratagène) préalablement clivé par *EcoRI*. On obtient pTG1669. Celui-ci est muté (kit Amersham) par introduction d'un site *BamHI* soit en position 27867 (oligonucléotide mutagène OTG6079 ; SEQ ID NO: 12) ou en position 28249 (oligonucléotide mutagène OTG6080 ; SEQ ID NO: 13). On obtient respectivement pTG1672 et pTG1673. On isole du vecteur pTG1676, le fragment *BamHI-BsiWI* comportant le LTR 3' de RSV

suivi de la partie 5' de la région E3 et on l'insère entre les sites *Bam*HII (position 27331 ou 30049) et *Bsi*W (position 28390) des vecteurs obtenus à l'étape précédente pour générer pTG1977 et pTG1978. Puis le fragment *Eco*RI obtenu de chacun de ces deux vecteurs est intégré dans pTG1679, en remplacement du fragment *Eco*RI sauvage. On obtient pTG1679-E3+. A titre indicatif, le vecteur pTG1679 résulte du clonage du fragment *Bsi*EII-*Kpn*I (site rendu franc par traitement à la T4 polymerase) de pTG6590 (exemple 3.1) entre les sites *Bsi*EII-*Bam*HII (site rendu franc par traitement à la Klenow polymérase) de pTG6584 (exemple 3.1).

On génère une particule d'adénovirus par recombinaison homologue dans une lignée de complémentation pour la fonction E1, entre le fragment *Aas*II de pTG1679-E3+ et un vecteur adénoviral tel que l'Ad dl324 ou Ad-RSV β -gal. Ce dernier contient le gène de la β -galactosidase à la place de la région E1 (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest., 90, 626-630).

EXEMPLE 3 : Construction d'un vecteur adénoviral recombinant à capacité de clonage améliorée par délétion partielle des régions E1 et E3

1. Construction de pTG6590 Δ E3

Le fragment portant la partie du génome de l'Ad5 comprise entre les nucléotides 27325 et 27871, est amplifié par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et à l'aide des amorces OTG6064 et OTG6065 (SEQ ID NO: 14 et 15). OTG6065 comprend à son extrémité 5' un site *Bsm*I, également présent dans la région E3 (en position 30750).

Le fragment amplifié est cloné dans le site *Sma*I de M13mp18, pour donner M13TG6523. Le fragment *Eco*RI-*Bsm*I est isolé de ce dernier pour être introduit dans le vecteur pTG6590 clivé par les mêmes enzymes. On obtient pTG6590 Δ 3, lequel contient la partie 3' du génome adénoviral (des nucléotides 27082 à 35935) déletée de la région E3 comprise entre les nucléotides 27872 à 30740, alors que pTG6590 est déléte d'une partie plus petite de la région E3 (position 28592 à 30470). Le vecteur pTG6590 est obtenu de la façon suivante : on génère par PCR un fragment s'étendant des nucléotides 35228 à 35935 (comportant l'ITR 3') à partir d'une préparation génomique d'Ad5 et à l'aide des amorces OTG5481 et OTG5482 (SEQ ID NO: 16 et 17). Celui-ci est, ensuite, cloné dans le site *Sma*I de M13mp18 pour donner M13TG6519. D'autre part, le vecteur pTG6584 est digéré par *Xba*I puis religué afin d'éliminer le fragment correspondant de la région E3. On obtient pTG6589, lequel est clivé par *Bam*HII, traité à la Klenow puis

digéré par *Bs*I/EII. On introduit dans le vecteur ainsi traité le fragment *Eco*RI (Klenow)-*Bs*I/EII purifié de M13TG6519, pour générer pTG6590.

A titre indicatif, le vecteur pTG6584 est un vecteur pUC19 (Gibco BRL) qui contient les 5 séquences d'Ad5 s'étendant du site unique *Spe*I (position 27082) jusqu'au début de la région promotrice de la région E4 (position 35826). Il est obtenu par digestion de pTG1659 (exemple 2.3) par *Sa*II et *Spe*I, traité à l'ADN polymérase Klenow puis religation.

10 2. Construction d'un vecteur adénoviral déléte de la région E1 et de la partie de E3 n'exprimant pas la protéine gp19kDa

La partie de la région E3 de l'Ad5 codant pour la gp19kDa (nucléotides 28731 à 29217) 15 est obtenue par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et en mettant en oeuvre les amores OTG5455 et OTG5456 (SEQ ID NO: 18 et 19). Le fragment généré est introduit dans le site *Sma*I de M13mp18 pour donner M13TG6520. On isole le fragment *Eco*RI-*Xba*I de ce dernier, que l'on clone dans le site *Aai*II de pTG1670 (exemple 2.3), les sites ayant été rendus francs par traitement à l'ADN polymérase Klenow. Puis, le fragment *Xba*I purifié du vecteur de l'étape précédente est inséré dans le 20 site *Xba*I du vecteur pTG6590ΔE3 (exemple 3.1.).

3. Obtention de particules adénovirales.

Les particules virales recombinantes sont obtenues par ligation des fragments *Spe*I isolés 25 de l'ADN génomique d'AdTG6303 ou AdTG6581 et de l'un ou l'autre des vecteurs des exemples 3.1 et 3.2. Puis, le mélange de ligation est transfété dans une lignée de complémentation pour la fonction E1.

EXEMPLE 4 : Construction d'un adénovirus déléte des régions E1 et E4.

30 On amplifie les parties du génome adénoviral s'étendant des nucléotides 31803 à 32799 et 35827 à 35935 à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et des amores OTG5728 et OTG5729 (SEQ ID NO: 20 et 21) et OTG5730 et OTG5481 (SEQ ID NO: 22 et 16) respectivement. Après une dizaine de cycles d'amplification, la réaction est 35 poursuivie à partir d'une aliquote des deux mélanges réactionnels en mettant en oeuvre les oligonucléotides OTG5728 et OTG5781. Le fragment amplifié s'étend des nucléotides 31803 à 35935 avec une délétion de l'intégralité de la région E4 (positions

32800 à 35826). Après digestion par *EcoRI* et *HindIII*, il est cloné entre les mêmes sites de M13mp18 pour donner M13TG6521.

5 M13TG6521 est digéré par *EcoRI*, traité à l'ADN polymérase klenow puis clivé par *BstXI*. Le fragment de 0,46 kb comportant l'ITR 3' est inséré entre le site *BamHI* rendu franc par traitement à l'ADN polymérase klenow et le site *BstXI* de pTG6584 (exemple 3.1). On obtient pTG6587, qui est digéré par *XbaI* puis religué sur lui-même, pour donner pTG6588 (délétion de E3).

10 On introduit dans le site *PacI* de pTG6588 un fragment d'ADN synthétique provenant de la réassociation des oligonucléotides OTG6060, OTG6061, OTG6062 et OTG6063 (SEQ ID N°: 23 à 26). Il résulte pTG8500 dans lequel les signaux de terminaison de la transcription des gènes tardifs LS sont améliorés.

15 On génère une particule adénovirale (AdΔE4) dont le génome est délesté de l'intégralité de la région E4 (nucléotides 32800 à 35826) et du fragment *XbaI* de la région E3 (nucléotides 28592 à 30470), par ligation des fragments *SpeI* isolés de pTG8500 ou pTG6588 et de l'Ad5. Le mélange de ligation est transfété dans une lignée cellulaire de complémentation pour la fonction E4, par exemple la lignée W162 (Weinberg et Ketner, 20 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5383-5386). On obtient un adénovirus défectif pour les fonctions E1 et E4 (ΔE1, ΔE4) par transfection dans une lignée de complémentation pour E1 et E4 (par exemple la lignée de l'exemple 8) du mélange de ligation entre le génome de l'Ad dl324 et le plasmide pTG8500 ou pTG6588 linéarisé par *SpeI*.

25 D'autre part, on peut également procéder de la manière suivante. On clone le fragment *SpeI-ScaI* isolé de pTG1659 (exemple 2.3) dans le vecteur pTG6588 clivé par ces mêmes enzymes, pour obtenir pTG6591. Ce dernier comporte les séquences de l'Ad5 des nucléotides 21062 à 35935 mais, comme précédemment, délestées de l'intégralité de la 30 région E4 et du fragment *XbaI* de la région E3. On introduit dans le vecteur pTG6591 digéré par *PacI*, le fragment d'ADN synthétique décrit ci-dessus et on génère pTG6597. Les particules adénovirales peuvent être obtenues par recombinaison homologue entre l'ADN génomique de l'Ad dl324 clivé par *SpeI* et les plasmides pTG6591 ou pTG6597 clivé par *BamHI*.

35 EXAMPLE 5 : Construction d'un virus "minimum"

Un vecteur adénoviral dit "minimum" est constitué par clonage dans un plasmide des éléments suivants :

- l'ITR 5' de l'Ad5 (des nucléotides 1 à 103) ;
- 5 - la région d'encapsidation de l'Ad5 (des nucléotides 104 à 458) ;
- une séquence nucléotidique exogène comprenant :
 - 10 * un premier gène d'intérêt thérapeutique placé de préférence sous le contrôle de son propre promoteur afin d'obtenir une régulation de l'expression la plus proche possible de la régulation naturelle,
 - * un deuxième gène d'intérêt constitué du gène TK-HSV-1, et
- 15 * de manière facultative, des séquences nucléotidiques quelconques ajoutées pour des raisons d'efficacité de replication ou d'encapsidation de manière à ce que la taille totale du génome à encapsider soit comprise entre 30 et 36kb ;
- 20 * les séquences codant pour la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Laughon et Gesteland, 1984, Mol. Cell. Biol., 4, 260-267) placées sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans une cellule eucaryote supérieure ; et
- 25 - l'ITR 3' de l'Ad5 (des nucléotides 35833 à 35935).

L'assemblage de ces différents éléments est réalisé selon les techniques standards de biologie moléculaire. L'obtention de virions infectieux comprenant un tel vecteur se fait comme décrit précédemment dans une lignée de complémentation de l'exemple 7.

30 EXEMPLE 6 : Constitution d'une cellule de complémentation capable de complémenter en trans la fonction E1.

35 1. Constitution d'une cellule de complémentation comprenant la région E1 des nucléotides 100 à 5297 (pTG6533)

Celle-ci comporte :

- une cassette d'expression du gène pac, lequel est placé sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40 (nucléotides 5171 à 5243) et comprend en 3' le signal de terminaison de la transcription de SV40 (nucléotides 2543 à 2618). Le gène pac utilisé correspond à un fragment allant du nucléotide 252 au nucléotide 905 de la séquence divulguée par Lacalle et al. (1989, Gene, 79, 375-380) et comportant 4 mutations par rapport à la séquence publiée (C en position 305 remplacé par A ; C en position 367 remplacé par T ; insertion d'un G en position 804 ; délétion d'un G en position 820),
- 5 10 - un fragment du génome de l'Ad5 allant des nucléotides 100 à 5297. Ce fragment comprend les régions E1A et E1B munies de leur propre promoteur et de leur signal de terminaison de la transcription ainsi qu'une fraction de la région E2, recouvrant ainsi les séquences codant pour la protéine IX - A titre indicatif, il semble que la lignée 293 ne soit pas capables de produire une protéine IX fonctionnelle.
- 15

La construction est réalisée en plusieurs étapes détaillées ci-après. Le vecteur p polyIII-I* (Lathe et al., 1987, Gene, 57, 193-201) est soumis à une digestion par les enzymes *AccI* et *EcoRI*. On clone dans le vecteur ainsi traité le fragment *EcoRI-ClaI* isolé du plasmide pTG6164. On obtient le vecteur pTG6528.

Le plasmide pTG6164 est issu de pLXSN (Miller D, 1989, Bio/Techniques, 7, 980) et comprend le gène pac placé sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40. Brièvement, le fragment *HindIII-KpnI* de pLXSN est introduit dans M13TG131 pour produire M13TG4194. On insère dans ce dernier, digéré par *NheI* et *KpnI*, le fragment *NheI-KpnI* de pMPSV H2 K IL2R (Takeda et al., 1988, Growth Factors, 1, 59-66) pour produire M13TG4196. Celui-ci est digéré par *HindIII-KpnI* et on clone le fragment issu d'une digestion *HindIII* et d'une digestion partielle *KpnI* et purifié de pLXSN. On obtient pTG5192. Ce dernier est digéré par *HindIII* et partiellement par *NheI* et on introduit le fragment *HindIII-NheI* de pBabe Puro (Land et al., 1990, Nucleic Acids Res., 18, 3587), donnant lieu à pTG6164.

Le vecteur pTG6528 est digéré par *PstI* et on introduit au niveau de ce site le fragment *PstI* isolé de pTG6185 (exemple 2.1) comportant le signal de terminaison de la transcription de SV40. On obtient pTG6529. Ce dernier est soumis à une digestion *EcoRI-HpaI* et ligué à deux fragments, d'une part un fragment *BspEI-BcgI* (positions 826 à 5297) purifié de l'ADN génomique d'Ad5 et d'autre part un fragment généré par PCR aux extrémités *EcoRI* et *BspEI*, pour donner pTG6531. Le fragment PCR est

généré par amplification génique à partir de l'ADN génomique d'Ad5 et des amores OTG4564 et OTG4565 (reporté dans les SEQ ID NO: 27 et 28). Le fragment amplifié est digéré par les enzymes *Eco*RI et *Bsp*EI et mis en ligation comme indiqué dans le paragraphe précédent.

5

Le vecteur pTG6531 comprend les 2 unités de transcription (celle de la région E1 et celle du gène pac) dans la même orientation. Pour éviter des interférences au niveau de la transcription, on les place dans une orientation tête bêche (réverse l'une par rapport à l'autre) en traitant le pTG6531 par *Bam*HI et en religant. Le vecteur pTG6533 10 correspond à un clone présentant l'orientation réverse des deux unités.

Le vecteur pTG6533 est transfété dans une lignée cellulaire mammifère, par exemple la lignée Vero (ATCC, CCL81) ou A549 (ATCC, CCL185) par la technique au phosphate de calcium. Les cellules transfectées sont cultivées selon les recommandations du fournisseur et sont placées 24 heures après la transfection en milieu sélectif contenant de la puromycine (concentration 6 µg/ml). On sélectionne les clones résistants sur lesquels on évalue l'expression des gènes de la région E1 afin de déterminer le clone le plus producteur, qui pourra être utilisé à titre de lignée de complémentation pour la préparation d'un adénovirus défectif pour la fonction E1, tel que celui détaillé dans 15 20 l'exemple 2.

On analyse l'expression des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1 par Northern blot en utilisant des sondes appropriées marquées à l'isotope ³²P. La production des protéines codées par la région E1A est détectée par immunoprecipitation 25 après marquage des cellules à l'isotope ³⁵S et à l'aide d'un anticorps commercial (Oncogène Science Inc., référence DP11).

On peut également vérifier la capacité des produits d'expression de la région E1A à activer le promoteur de la région E1B (par analyse des ARNm E1B par Northern blot) 30 ou à activer le promoteur de la région E2 (par dosage de l'activité enzymatique après transfection transitoire d'un plasmide "reporteur" comprenant le gène CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase) placé sous le contrôle du promoteur E2).

Enfin, on peut infecter ces cellules par l'Ad-RSV-βgal (Stratford-Perricaudet et al., 1992, 35 *supra*) et titrer le virus par la technique agar dès qu'on observe un effet cytopathique. En général, on procède de la façon suivante : les cellules sont infectées à une moi (multiplicité d'infection) de 10. Environ 48 heures après l'infection, l'effet cytopathique étant visible, on lyse les cellules et on dose l'activité β-galactosidase selon le protocole

conventionnel (voir par exemple Maniatis et al., 1989, *supra*). Les clones positifs sont réinfectés à une moitié plus faible. 48 heures après l'infection, on récolte le surnageant et les cellules selon les techniques classiques. On détermine le titre viral par la méthode sous agar en utilisant des cellules 293. Le rapport du titre obtenu sur le titre de départ 5 constitue le facteur d'amplification.

2. Construction d'une lignée de complémentation comprenant la région E1 des nucléotides 505 à 4034 (pTG6557, pTG6558, pTG6559, pTG6564 et pTG6565)
- 10 Les vecteurs pTG6557, pTG6558 et pTG6559 comprennent :
- (i) une cassette d'expression du gène pac (nucléotides 252 à 905 comme précédemment) sous le contrôle :
- 15 - du promoteur E2A de l'Ad2 (nucléotides 27341 à 27030) (dans pTG6558),
- du promoteur E2A de l'Ad2 déleté des séquences comprises entre les nucléotides 27163 à 27182 (pour pTG6557). Une telle mutation permet de diminuer le niveau de base du promoteur E2A, sans affecter 20 l'inductibilité par la protéine trans-activatrice codée par E1A, ou
- du promoteur précoce SV40 pour pTG6559.
- 25 Dans les trois cas, elle comporte également en 3' le signal de terminaison de la transcription du virus SV40 (nucléotides 2543 à 2618) ; et
- (ii) une cassette d'expression comportant la partie de la région E1 de l'Ad5 allant des nucléotides 505 à 4034. Cette portion du génome adénoviral contient l'intégralité 30 des séquences codant pour les protéines précoce de la région E1A, le signal de terminaison de la transcription de l'unité E1A, le promoteur E1B (inductible par la protéine trans-activatrice codée par E1A) et l'intégralité des séquences codantes de la région E1B. Elle inclut également les séquences codant pour la protéine IX, qui chevauchent la région E1B. Cependant, elle est dépourvue du promoteur de la 35 région E1A et du signal de terminaison de la transcription des unités transcriptionnelles E1B et IX. Afin de permettre l'expression des séquences de la région E1, on introduit en 5' du fragment adénoviral, le promoteur du gène murin PGK et en 3' le signal de terminaison de la transcription du gène β-globine de lapin

(nucléotides 1542 à 2064 de la séquence divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence K03256).

5 De manière facultative, on peut également introduire des séquences nucléotidiques quelconques, par exemple isolées de pBR322 (Bolivar et al., 1977, Gène, 2, 95-113), entre les cassettes d'expression du gène pac et de la région E1 ; afin d'éviter d'éventuelles interférences transcriptionnelles.

La construction de ces vecteurs s'effectue en plusieurs étapes reportées ci-dessous.

10 En premier lieu, on amplifie par PCR, la partie du génome de l'Ad5 allant du nucléotide 505 au nucléotide 826 à partir d'une préparation génomique et des amores OTG5013 qui comprend en 5' un site *Pst*I utile pour les étapes de clonage ultérieures (SEQ ID NO: 29) et OTG4565 chevauchant le site *Bsp*E1 (SEQ ID NO: 28). Le fragment généré par 15 PCR, est traité à l'ADN polymérase Klenow puis introduit dans le site *Sma*I de M13mp18 donnant lieu à M13TG6512. La séquence du fragment PCR est vérifiée.

20 Le vecteur pTG6533 (exemple 6.1) est digéré par les enzymes *Eco*RI et *Bsp*E1. On lie le vecteur ainsi traité avec, d'une part, le fragment *Pst*I-*Bsp*E1 isolé de M13TG6512 et, d'autre part, le fragment *Eco*RI-*Pst*I isolé de pKJ-1. Ce dernier comprend la portion du promoteur du gène murin PGK, située entre les nucléotides -524 et -19, dont la séquence est reportée dans Adra et al. (1987, Gene, 60, 65-74). Cette étape donne lieu au pTG6552 et permet d'insérer le promoteur du gène murin PGK en amont de la région E1 25 de l'Ad5 débutant au nucléotide 505.

25 Par ailleurs, le fragment *Xba*I-*Bam*HI, dont l'extrémité générée par *Xba*I est rendue franche suite au traitement par l'ADN polymérase Klenow, est purifié de pBCMG Neo (Karasuyama et al., 1989, J. Exp. Med., 169, 13-25). Ce fragment, qui comprend le signal de terminaison de la transcription du gène β-globine de lapin, est introduit entre les 30 sites *Sma*I et *Bam*HI du vecteur p polyII-Sfi/Not-14* (Lathe et al., 1987, Gene, 57, 193-201). Le vecteur pTG6551 qui résulte, est quant à lui digéré par les enzymes *Sph*I et *Eco*RV afin d'y insérer un fragment du génome de l'Ad5 allant du nucléotide 3665 au nucléotide 4034. Ce fragment est généré par PCR selon le protocole standard. On utilise une préparation d'ADN génomique d'Ad5 à titre de matrice et les amores OTG5015 qui 35 recouvre le site interne *Sph*I en position 3665 (SEQ ID NO: 30) et OTG 5014 comprenant en 5' un site *Bgl*II (SEQ ID NO: 31).

Le fragment PCR est traité par l'ADN polymérase Klenow avant d'être cloné dans le site *SmaI* de M13mp18, générant M13TG6516. Après vérification de sa séquence, le fragment PCR est resorti par digestion par *BglII*, traitement à l'ADN polymérase Klenow et digestion par *SphI*. Il est inséré entre les sites *SphI* et *EcoRV* de pTG6551. Il en résulte pTG6554.

D'autre part, le vecteur pTG6529 (exemple 6.1) est soumis à une digestion par les enzymes *HpaI* et *HindIII*. On purifie le fragment de 2,9 kb comportant le gène pac suivi du signal de terminaison de la transcription du virus SV40. Celui-ci est ligué au fragment *SmaI-HindIII* isolé de pE2 Lac (Boeuf et al., 1990, Oncogene, 5, 691-699) qui porte le promoteur E2A de l'Ad2. On obtient le vecteur pTG6556. De manière alternative, il peut être ligué au fragment *SmaI-HindIII* isolé de pE2 Lac D9170 (Zajchowski et al., 1985, EMBO J., 4, 1293-1300) qui porte le promoteur E2A muté de l'Ad2. On obtient, dans ce cas, pTG6550.

pTG6556 est digéré par les enzymes *EcoRI* et *BamHI*. On insère entre ces sites, le fragment *EcoRI-SacII* isolé de pTG6552 et le fragment *SacII-BamHI* isolé de pTG6554. On obtient le vecteur pTG6558. La même étape réalisée sur pTG6550 et pTG1643 (exemple 7.1) génère pTG6557 et pTG6559 respectivement.

pTG6557 et pTG6558 sont digérés par *EcoRV*, site unique situé entre les deux cassettes d'expression (gène pac et région E1). On clone dans ce site, un fragment *EcoRV-PvuII* de 1,88kb isolé de pBR322 (Bolivar et al., *supra*), afin d'éloigner les deux promoteurs. On génère respectivement pTG6564 et pTG6565.

Les vecteurs pTG6557, pTG6558, pTG6559, pTG6564 et pTG6565 sont transfectés dans la lignée cellulaire A549. Comme précédemment, on sélectionne les clones résistant à la puromycine et on vérifie l'expression de la région E1. Les clones exprimant E1 sont destinés à amplifier et propager des adénovirus défectifs pour la fonction E1. La production des produits d'expression de E1 s'accompagne d'un effet cytotoxique mais l'analyse par Southern ne permet pas de mettre en évidence des réarrangements de vecteurs. Après infection par l'Ad-RSV - βgal, plusieurs clones sont capables d'amplifier le virus d'un facteur supérieur à 100.

35 3. Construction d'une cellule de complémentation inductible par la protéine Gal4 de Saccharomyces cerevisiae.

Ces vecteurs comprennent comme précédemment la partie de la région E1 de l'Ad5 allant du nucléotide 505 à 4034. Cependant l'expression des séquences de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible constituée d'une part du promoteur minimal MLP d'Ad2 (TATA box et signal d'initiation de la transcription ; nucléotides -34 à +33) et d'autre part d'une séquence d'activation du gène Gal 10 activable par la protéine Gal4. La séquence consensus d'activation de 17 nucléotides (17MX), qui correspond au site de fixation de Gal4 est spécifiée dans Webster et al. (1988, Cell, 52, 169). Le signal de terminaison de la transcription du gène de la β-globine de lapin est placé en 3' de l'unité transcriptionnelle E1B.

10

On synthétise un premier fragment d'ADN comprenant un dimère de la séquence 17MX (SEQ ID NO: 32 et 33) suivi du promoteur minimal MLP d'Ad2 et muni en son extrémité 5' d'un site *SaII* et en son extrémité 3' d'un site *BamHI*. Le site *SaII* est rendu franc par traitement à l'ADN polymérase klenow. Par ailleurs, on synthétise un second fragment d'ADN comprenant un pentamère de la séquence suivi du même promoteur et muni en 5' et 3' des sites *XbaI* et *BamHI*. Après digestion par *XbaI*, l'extrémité est rendue franche par traitement à la Klenow polymérase.

20

Chacun de ces fragments est introduit dans le site *BgIII* de p poly II pour générer respectivement pTG1656 et pTG1657. Puis on introduit dans chacun des vecteurs préalablement digérés par *PstI-BamHI*, les deux fragments suivants : le fragment *PstI-XbaI* isolé de pTG6552 (Exemple 6.2) et le fragment *XbaI-BamHI* isolé de pTG6559 (exemple 6.2). On obtient pTG1660 et pTG1661 respectivement (Figure 5).

25

Les cellules A549 sont co-transfектées avec pTG1643 (vecteur d'expression du gène pac) et soit pTG1660 soit pTG1661. Les clones sont sélectionnés pour leur résistance à la puromycine et étudiés comme indiqué précédemment. Environ 50% des clones A549-1660 et A549-1661 produisent des produits d'expression de la région E1. Cependant, la production s'accompagne d'un effet cytotoxique, modifiant l'aspect morphologique des cellules.

30

L'intégration et le non réarrangement des plasmides dans le génome cellulaire est vérifié par Southern. Aucune modification substantielle des plasmides intégrés (pTG1643, pTG1660 et pTG1661) ne peut être mise en évidence dans les clones producteurs analysés. On peut également vérifier l'inductibilité de l'expression des séquences codées par la région E1A en présence de Gal4 (par transformation par un plasmide permettant l'expression constitutive de la protéine Gal4).

Après l'infection de plusieurs clones producteurs par l'Ad-RSV-Bgal à une moi d'environ 2, deux clones A549-1660 sont capables d'amplifier le stock viral d'un facteur supérieur à 100.

5 **EXEMPLE 7 : Constitution d'une lignée de complémentation pour l'ensemble des fonctions essentielles à la réPLICATION d'un adénovirus.**

On construit un vecteur comprenant l'ensemble du génome adénoviral de l'Ad5 à l'exception de l'ITR 5', l'ITR 3' et la région d'encapsidation.

10

Le vecteur pTG6528 (exemple 6.1) est digéré par les enzymes *Pst*I et *Bgl*II entre lesquels on insère un fragment d'ADN synthétisé chimiquement selon le protocole standard constitué des oligonucléotides des OTG5039 et OTG5040 (SEQ ID NO: 34 et 35). La séquence des oligonucléotides est conçue de manière à ne pas reconstituer le site de clonage *Pst*I et introduire un site *EcoRV*. On obtient pTG1639, lequel est linéarisé par digestion par *EcoRV* et ligué à un fragment *Xba*I-*Bam*HI dont les extrémités sont rendues franches par traitement à l'ADN polymérase Klenow. Ce fragment est porteur du signal de terminaison de la transcription du virus SV40. Tout plasmide comportant un signal entouré des sites de restriction adéquates peut être utilisé à cette étape.

20

Le vecteur pTG1640 ainsi généré, est digéré par *Bam*HI et *Bgl*II et le fragment porteur de la cassette d'expression du gène pac est introduit dans le site *Bgl*II du vecteur pPolyII-Sfi/Not-14*. On obtient le pTG1641. Celui-ci est linéarisé par *No*I et traité à l'ADN polymérase Klenow. On introduit le fragment *Bam*HI-*Sa*II de 0,276 kb isolé de pBR322 (Bolivar et al., *supra*) également traité à l'ADN polymérase Klenow. Ceci donne lieu à pTG1643.

Le pTG1643 est linéarisé par *Xho*I et on insère dans ce site un fragment hybride *Xho*I comportant un dimère 17MX suivi du promoteur minimum du gène TK-HSV-1 (nucléotides 303 à 450 de la séquence divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence V00467 et complétée en 3' d'un site *Xho*I). On obtient le pTG1647 dans lequel le promoteur hybride 2x17MX-TK-HSV-1 est inséré dans la même orientation que la cassette d'expression du gène pac.

35 Cette construction, pTG1647, sert de vecteur de base pour introduire entre les sites *Pst*I et *Bam*HI un fragment du génome de l'Ad5 allant du nucléotide 505 au nucléotide 35826. Dans un premier temps, le pTG1647 est digéré par *Pst*I et *Bam*HI puis ligué, d'une part, au fragment *Pst*I-*Cla*I de pTG6552 (exemple 6.2) comportant la partie du

génome de l'Ad5 des nucléotides 505 à 918 et, d'autre part, au fragment *Cla*I-*Bam*HI (positions 918 à 21562) préparé à partir de l'ADN génomique de l'Ad5. Le vecteur ainsi obtenu, comporte la partie 5' de l'Ad5 à l'exception de l'ITR5' et de la région d'encapsidation.

5

Par ailleurs, la partie 3' du génome de l'Ad5 est assemblée dans le vecteur ppolyII-Sfi/Not-14*. Ce dernier est linéarisé par *Bam*HI et on introduit le fragment *Bam*HI-*Avr*II (nucléotides 21562 à 28752) du génome de l'Ad5 et un fragment PCR correspondant aux nucléotides 35463 à 35826 de l'Ad5. Ce dernier est généré à partir de l'ADN génomique de l'Ad5 et des amorces OTG5024 (SEQ ID NO: 36) et OTG5025 (SEQ ID NO: 37) et comporte en 5' un site *Bam*HI. Le vecteur obtenu est digéré par *Avr*II et on insère le fragment *Avr*II isolé de l'ADN génomique de l'Ad5 et s'étendant des positions 28753 à 35462.

10

Le fragment *Bam*HI comportant les séquences adénovirales est introduit dans le site *Bam*HI du vecteur de l'étape précédente comportant la partie 5' du génome adénoviral dépourvu de l'ITR 5' et la région d'encapsidation.

15

Une lignée de complémentation capable de complémer l'ensemble des fonctions d'un adénovirus défectif est générée par transfection dans une lignée cellulaire, comme A549, selon le protocole décrit dans les exemples précédents.

20

On peut également procéder en construisant quatre vecteurs comportant la quasi totalité du génome adénoviral qui sera réassemblé sur un seul vecteur lors de l'étape finale.

25

- pTG1665 correspond au clonage du fragment *Bsp*E1 (nucléotides 826 à 7269) isolé d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5, dans le site *Xma*I de p poly II-Sfi/Not-14 * ;

30

- pTG1664 est généré par l'insertion du fragment *No*rI (nucléotides 6503 à 1504) isolé d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5, dans le site *No*rI du même vecteur.

35

- pTG1662 est obtenu par introduction du fragment *Aat*II (nucléotides 10754 à 23970) isolé d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 dans le site *Aat*II de p polyII.

- pTG1659 comportant la partie 3' du génome d'Ad5 (exemple 2.3).

Puis on introduit un fragment comportant un système d'expression inducible comme le promoteur décrit à l'exemple 6.3 ou 7 inducible par Gal4 ou un promoteur de l'art antérieur comme le promoteur metallothionéine ou tétracycline. Un tel fragment est placé 5 en amont des séquences 5' de l'Ad5 (nucléotides 505 à 918) dans le vecteur pTG1665 digéré par *Aat*II et *Cla*I. Enfin, on clone successivement dans le vecteur précédent et aux sites correspondants les fragments *No*I de pTG1664, *Aat*II de pTG1662 et enfin *Bam*HI de pTG1659.

10 Une lignée de complémentation est générée par co-transfection du vecteur précédent et de pTG1643 et on isole les clones résistants à la puromycine. Cette lignée est plus particulièrement destinée à amplifier et encapsider les vecteurs adénoviraux de l'exemple 5 défectifs pour les fonctions E1, E2 et E4 et les fonctions tardives.

15 EXEMPLE 8 : Constitution d'une lignée de complémentation pour les fonctions E1 et E4.

Le vecteur pTG1647 (exemple 7) est digéré par les enzymes *Pst*I-*Bam*HI et on introduit dans le vecteur ainsi traité 3 fragments :

20 - le fragment *Pst*I-*Xba*I de pTG6552 (exemple 6.2) portant les séquences d'Ad5 du nucléotide 505 au nucléotide 1339,

25 - le fragment *Xba*I-*Sph*I de pTG6552 portant les séquences d'Ad5 du nucléotide 1340 au nucléotide 3665, et

- le fragment *Sph*I-*Bam*HI de pTG6554 (exemple 6.2) portant les séquences d'Ad5 du nucléotide 3665 à 4034 et un signal de terminaison de la transcription.

30 Le vecteur ainsi obtenu est coupé par *Bam*HI et on introduit dans ce site trois fragments qui sont les suivants :

35 - un fragment digéré par *Bam*HI-*Aat*II généré par PCR correspondant à la séquence de l'Ad5 situé entre les positions 32800 à 33104. On utilise l'ADN génomique d'Ad5 comme matrice et les amorces OTG5078 (SEQ ID NO: 38) et OTG5079 (SEQ ID NO: 39),

- le fragment *Af*_{II}-*Avr*_{II} isolé de l'ADN génomique d'Ad5 (nucléotides 33105 à 35463),
- le fragment *Avr*_{II}-*Bam*_{HI} généré par PCR à l'aide des amores OTG5024 et OTG5025 (voir exemple 7).

5 Le vecteur ainsi généré est introduit dans une lignée cellulaire selon le protocole décrit précédemment, pour constituer une lignée de complémentation pour les fonctions E1 et E4.

10

Par ailleurs, une telle lignée peut également être obtenue selon le protocole suivant :

15 La région E4 du génome de l'Ad5 (nucléotides 32800 à 35826) est reconstituée en plusieurs étapes. La partie allant des nucléotides 33116 à 32800 est synthétisée par PCR à partir de l'ADN génomique d'Ad5 avec le couple d'amores OTG5078 et OTG5079 (SEQ ID NO: 38 et 39), puis insérée dans le site *Eco*RV de M13TG130, pour générer M13TG1645.

20 Le fragment *Bam*_{HI}-*Af*_{II} de ce dernier est engagé dans une réaction de ligation avec le fragment *Af*_{II}-*Avr*_{II} d'Ad5 (nucléotides 33104 à 35463) et le vecteur pTG7457 digéré par *Bam*_{HI} et *Avr*_{II}. On obtient pTG1650.

25 Puis on complète la région E4 par obtention du fragment correspondant aux nucléotides 35826 à 35457 par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et des amores OTG5024 et OTG5025 (SEQ ID NO: 36 et 37). Celui-ci est inséré dans le site *Sma*I de M13mp18 pour donner M13TG1646. Le fragment *Avr*_{II}-*Eco*RI est isolé de ce dernier et cloné entre les sites *Avr*_{II} et *Eco*RI de pTG1650. On obtient pTG1652.

30 Le fragment *Bam*_{HI} comportant la région E4 d'Ad5 est isolé de pTG1652 et cloné dans le site *Bam*_{HI} de pTG1643, de pTG6559 (exemple 6.2) ou dans le site *Ssp*I de pTG6564 (exemple 6.2) après avoir rendu les sites francs, pour générer pTG1653, pTG1654 et pTG1655 (Figure 6) respectivement.

35 On génère par des techniques conventionnelles une cellule de complémentation capable de complémer *en trans* les fonctions E1 et E4, par :

- (1) transformation de pTG1653 dans la lignée cellulaire 293, ou
- (2) transformation de pTG1654 ou pTG1655 dans la lignée cellulaire A549.

D'une manière générale, l'expression des produits des régions E1 et E4 s'accompagne d'un effet cytotoxique. Un certain nombre de clones 293-1653 est capable de complémenter à la fois des adénovirus déletés de E1 et des adénovirus déletés de E4.

5 Une autre alternative consiste à procéder de la manière suivante.

Le vecteur M13TG1646 est soumis à une mutagénèse dirigée avec l'oligonucléotide mutagène OTG5991 (SEQ ID NO: 40) dans le but de déléter le promoteur de la région E4 et d'insérer un site *Hpa*I. Le vecteur muté est désigné M13TG6522. Il est digéré par
10 *Pst*I, traité à l'ADN polymérase du phage T4 puis par *Avr*II et mis en ligation avec un fragment *Eco*RI (Klenow)-*Avr*II purifié de pTG1652 (exemple 8), pour donner pTG6595. Ce dernier est clivé par *Hpa*I et on introduit le fragment de 0,8 kb obtenu de pTG5913 (Figure 7) après digestion *Bgl*II et *Bam*HI et traitement à la Klenow. On
15 génère pTG6596 dans lequel la région E4 (positions 32800 à 35826) est placée sous le contrôle du promoteur TK. A titre indicatif, pTG5913 porte le gène TK-HSV-1 et le fragment *Bgl*II-*Bam*HI correspond au promoteur de ce gène (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 1441 - 1445).

Parallèlement, les vecteurs pTG1643 et pTG6559 (exemple 6) sont linéarisés par *Bam*HI
20 et on insère un fragment synthétique issu de la réassociation des oligonucléotides OTG6141 et OTG6142 (SEQ ID NO: 41 et 42), pour obtenir respectivement pTG8508 et pTG8507. Ces derniers sont clivés par *Bam*HI avant d'introduire le fragment *Bam*HI purifié de pTG6596 comportant la cassette d'expression de E4. On génère les vecteurs pTG8512 (Figure 8) et pTG8513 (Figure 9).

25 D'autre part, l'introduction du fragment *Bam*HI de pTG1652 dans le vecteur pTG8508 ou pTG8507 linéarisé par la même enzyme aboutit à pTG8514 et pTG8515 respectivement (Figures 10 et 11).

30 Les lignées cellulaires transfectées par pTG8512 ou pTG8515 permettront de complémenter un adénovirus défectif pour la fonction E4, alors que celles résultant de la transfection de pTG8513 ou pTG8514 sont destinées à amplifier et propager des adénovirus défectifs pour les fonctions E1 et E4. De même, la transfection de pTG8512 ou pTG8515 dans les cellules 293 permettront de complémenter des adénovirus défectifs pour E1 et E4.
35

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: TRANSGENE
- (B) RUE: 11, rue de Molsheim
- (C) VILLE: STRASBOURG
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 88.27.91.00
- (H) TELECOPIE: (33) 88.22.58.07

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveaux adenovirus defectifs et lignees de complementation correspondantes

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 42

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4174)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GTGACGTCTT TGGTGTTTC GCAGGAAAC

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4173)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:
ACCGAGTAAG ATTTGTCTAG GGCCGCGGGG 30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 33 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4191)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:
GGCCATGGTC GCGGGAAAGG GACTTTGACC GTT 33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5021)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:
GAACGGATCC CCAGACTCTG TTTGGATTG G 31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5157)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CCAGAAATAT CTTGGCCAG GCCGCCGCC

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5564)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GATCCGATAT CCCGTTAAC

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5565)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GATCGGTTAA CGGGATATCG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 47 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5892)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GTCGTAGGAT CCAGCTGCTC CCTGCTTGTG TGTTGGAGGT CGCTGAG

47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 47 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5893)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGT GGTGAATGGT CAAATGG

47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5920)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

ACGGTAGGAT CCGACGTCGG TGAGCTCCTC GCTTGGTCTC CGTCCG

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5891)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CAACCCCGAT TCTAGAGAAA CCTG

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6079)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GCGCAGTTGC TCTGCGGATC CACTAACAT TCAGT

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6080)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

TAAAAGTACC AGGTAAGGAT CCCCTTGGTT TGCTTGGG

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6064)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GAAACCGAAT TCTCTTGGAA C

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6065)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

ACGAATGCAG CTCTCCACTT AACATTCACT CG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5481)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

CAGTGAATTC ATCATCAATA ATATACC

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5482)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

AAACTGGTCA CCGTGATTAA AAAG

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5455)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

ATCGGAATTC AAGATGATTA GGTAC

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5456)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5728)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

TGTAGCAGGA GGACTAAG

18

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5729)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

CCGCATTAAT TAACCGCGAC AAACGATTCT TTATTCTTG

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID.NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (5730)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

CGCGGTTAAT TAATGCGGTA AACCTACGT CACCCG

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6060)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

AATAAAAGAT CATTATTTTC ATTAGAACTG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6061)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

TGTGTTGGTT TTTTGTGT TAAT

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6062)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

TAACACACAA AAAACCAACA CACAGTTCTA

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6063)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ATGAAAATAA TGATCTTTA TTAT

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 27:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 32 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4564)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

TCCGTGAATT CTAGTAGTGT GGCGGAAGTG TG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 28:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 23 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4565)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

23

TCCAGTCCGG AGAACCGGGC GCC

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 29:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5013)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

TAACCTGCAG GAGTGCCAGC GAGTAGAG

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 30:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Oligonuclotide de synthese (OTG5015)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

CAACGCGCAT GCCCCCATGG G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 31:

- (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
 (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5014)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:
TAGGAGATCT GTTTAAACC GCATTGGGAG G

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 32:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 34 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

CGGAGTACTG TCCTCCGGGG AGTACTGTCC TCCG

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 33:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 34 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

CGGAGGACAG TACTCCGGGG AGGACAGTAC TCCG

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 34:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 16 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5039)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

TGCTGGATAT CAGTCA

16

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5040)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

GATCTGACTG ATATCCAGCA TGCA

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5024)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

CTCCTGCCTA GGCAAAATAG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5025)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

GCAGATGGAT CCGGGCGGAG TAACTTGTAT GT

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5078)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

GTCGCGGATC CGTTATGTTT CAACGTGTTT A

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5079)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

ACATGAACCTT AAGCGAGCTG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 38 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5991)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

CACGGCACCA GCTCAAGTTA ACGGATCCAT CTGCGGGT

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6141)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

GATCCTGTGT GTTGGTTTT TGTGTGC

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6142)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

GATCGCACAC AAAAAACCAA CACACAG

27

Revendications

1. Un vecteur adénoviral défectif pour la réPLICATION, capable d'être encapsidé dans une cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus comprenant de 5' en 3', un ITR 5', une région d'encapsidation, une région E1A, une région E1B, une région E2, une région E3, une région E4 et un ITR 3', par délétion :
 - (i) de tout ou partie de la région E1A, et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces ; ou
 - (ii) de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins une région sélectionnée parmi les régions E2 et E4 ; ou
 - (iii) de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.
2. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces.
3. Un vecteur adénoviral selon la revendication 2, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E3.
4. Un vecteur adénoviral selon la revendication 2 ou 3, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E2.
5. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 2 à 4, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E4.
6. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie de la région E2.
7. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie de la région E4.

8. Un vecteur adénoviral selon la revendication 6 ou 7, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1B.
9. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 6 à 8, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E3.
10. Un vecteur adénoviral selon la revendication 6, 8 ou 9, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E4.
11. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 3 à 5, 9 ou 10, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion partielle de la région E3 dudit génome en maintenant la partie de ladite région E3 codant pour la protéine gp19kDa.
12. Un vecteur adénoviral selon la revendication 11, dans lequel la partie de la région E3 codant pour la protéine gp19kDa est placée sous le contrôle des éléments appropriés à l'expression de ladite protéine dans la cellule hôte.
13. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 12, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.
14. Un vecteur adénoviral selon la revendication 13, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région d'encapsidation :
 - (i) s'étendant du nucléotide 270 au nucléotide 346 ;
 - (ii) s'étendant du nucléotide 184 au nucléotide 273 ; ou
 - (iii) s'étendant du nucléotide 287 au nucléotide 358.
15. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14, qui dérive du génome d'un adénovirus sélectionné parmi les adénovirus canins aviaires et humains.
16. Un vecteur adénoviral selon la revendication 15, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5.

17. Un vecteur adénoviral selon la revendication 16, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région E1B s'étendant du nucléotide 1634 jusqu'au nucléotide 4047 au moins.
18. Un vecteur adénoviral selon la revendication 16 ou 17, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 notamment par délétion de la partie de la région E3 s'étendant du nucléotide 27871 jusqu'au nucléotide 30748.
19. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 16 à 18, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région E4 s'étendant du nucléotide 32800 au nucléotide 35826.
20. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 19, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 18 % du génome dudit virus.
21. Un vecteur adénoviral selon la revendication 20, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 22 % du génome dudit virus.
22. Un vecteur adénoviral selon la revendication 21, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 40 % du génome dudit virus.
23. Un vecteur adénoviral selon la revendication 22, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 95 % du génome dudit virus.
24. Un vecteur adénoviral selon la revendication 23, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de l'ensemble du génome dudit adénovirus à l'exclusion des ITRs 5' et 3' et de tout ou partie de la région d'encapsidation.
25. Un vecteur adénoviral selon la revendication 24, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie du génome viral s'étendant des nucléotides 459 à 35832.
26. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 25, qui comprend en outre une séquence nucléotidique exogène.
27. Un vecteur adénoviral selon la revendication 26, qui comprend en outre un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.

28. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 26 ou 27, qui comprend en outre un gène codant pour une protéine trans-activatrice de transcription non adénovirale ; ledit gène étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires à l'expression de ladite protéine dans une cellule hôte.
29. Un vecteur adénoviral selon la revendication 28, comprenant le gène codant pour la protéine trans-activatrice de transcription Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.
30. Une particule d'adénovirus comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29.
31. Une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29 ou une particule d'adénovirus selon la revendication 30.
32. Une lignée de complémentation comportant un élément de complémentation, comprenant notamment une partie de la région E1 du génome d'un adénovirus à l'exclusion de l'ITR 5' ; ledit élément de complémentation étant capable de complémer *en trans* un vecteur adénoviral défectif et étant intégré dans le génome de ladite lignée de complémentation ou inséré dans un vecteur d'expression.
33. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et
 - (ii) tout ou partie d'au moins une région dudit génome sélectionnée parmi les régions E1B, E2 et E4.
34. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et
 - (ii) tout ou partie d'au moins deux des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.
35. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et

- (ii) tout ou partie des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.
36. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 33 à 35, comprenant notamment tout ou partie de la région E1A et l'intégralité de la région E1B du génome d'un adénovirus codant pour les protéines précoces.
37. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 36, comprenant notamment une partie du génome d'un adénovirus sélectionné parmi les adénovirus canins, aviaires et humains.
38. Une lignée de complémentation selon la revendication 37, comprenant notamment une partie du génome d'un adénovirus humain de type 5.
39. Une lignée de complémentation selon la revendication 38, comprenant notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 :
- (i) s'étendant du nucléotide 100 au nucléotide 5297 ;
 - (ii) s'étendant du nucléotide 100 au nucléotide 4034 ; ou
 - (iii) s'étendant du nucléotide 505 au nucléotide 4034.
40. Une lignée de complémentation selon la revendication 38 ou 39, comprenant notamment la partie de la région E4 du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant du nucléotide 32800 au nucléotide 35826.
41. Une lignée de complémentation selon la revendication 38, comprenant notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant du nucléotide 505 au nucléotide 35826.
42. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 41, comprenant une partie de la région E1A du génome d'un adénovirus dépourvue de son promoteur naturel ; ladite partie étant placée sous le contrôle d'un promoteur approprié.

43. Une lignée de complémentation selon la revendication 42, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription non-adénovirale.
44. Une lignée de complémentation selon la revendication 43, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription codée par un vecteur adénoviral selon la revendication 28 ou 29.
45. Une lignée de complémentation selon la revendication 43 ou 44, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par la protéine trans-activatrice de transcription Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.
46. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 45, comprenant en outre un gène codant pour un marqueur de sélection.
47. Une lignée de complémentation selon la revendication 46, dans laquelle le gène de sélection code pour la puromycine acetyl-transférase.
48. Une lignée de complémentation selon la revendication 46 ou 47, dans laquelle le gène de sélection est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription codée par la région E1A du génome d'un adénovirus sauvage, notamment sous le contrôle du promoteur de la région E2 dudit génome.
49. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 48, dérivée d'une lignée cellulaire acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
50. Une lignée de complémentation selon la revendication 49, dérivée d'une lignée cellulaire sélectionnée parmi les lignées Vero, BHK, AS49, MRC5, W138 et CHO.
51. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 48, dérivée d'une cellule de la rétine d'un embryon humain.
52. Un procédé de préparation d'une particule d'adénovirus selon la revendication 30, selon lequel :

- (i) on introduit un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29 dans une lignée de complémentation capable de complémenter *en trans* ledit vecteur adénoviral pour obtenir une lignée de complémentation transfectée ;
 - (ii) on cultive ladite lignée de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule d'adénovirus ; et
 - (iii) on récupère ladite particule d'adénovirus dans la culture cellulaire.
53. Un procédé selon la revendication 52, selon lequel on met en oeuvre une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51.
54. Usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29, d'une particule d'adénovirus selon la revendication 30 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé selon la revendication 52 ou 53, d'une cellule hôte eucaryote selon la revendication 31 ou d'une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51.
55. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29, une particule d'adénovirus selon la revendication 30 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé selon la revendication 52 ou 53, une cellule eucaryote selon la revendication 31 ou une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

1/11

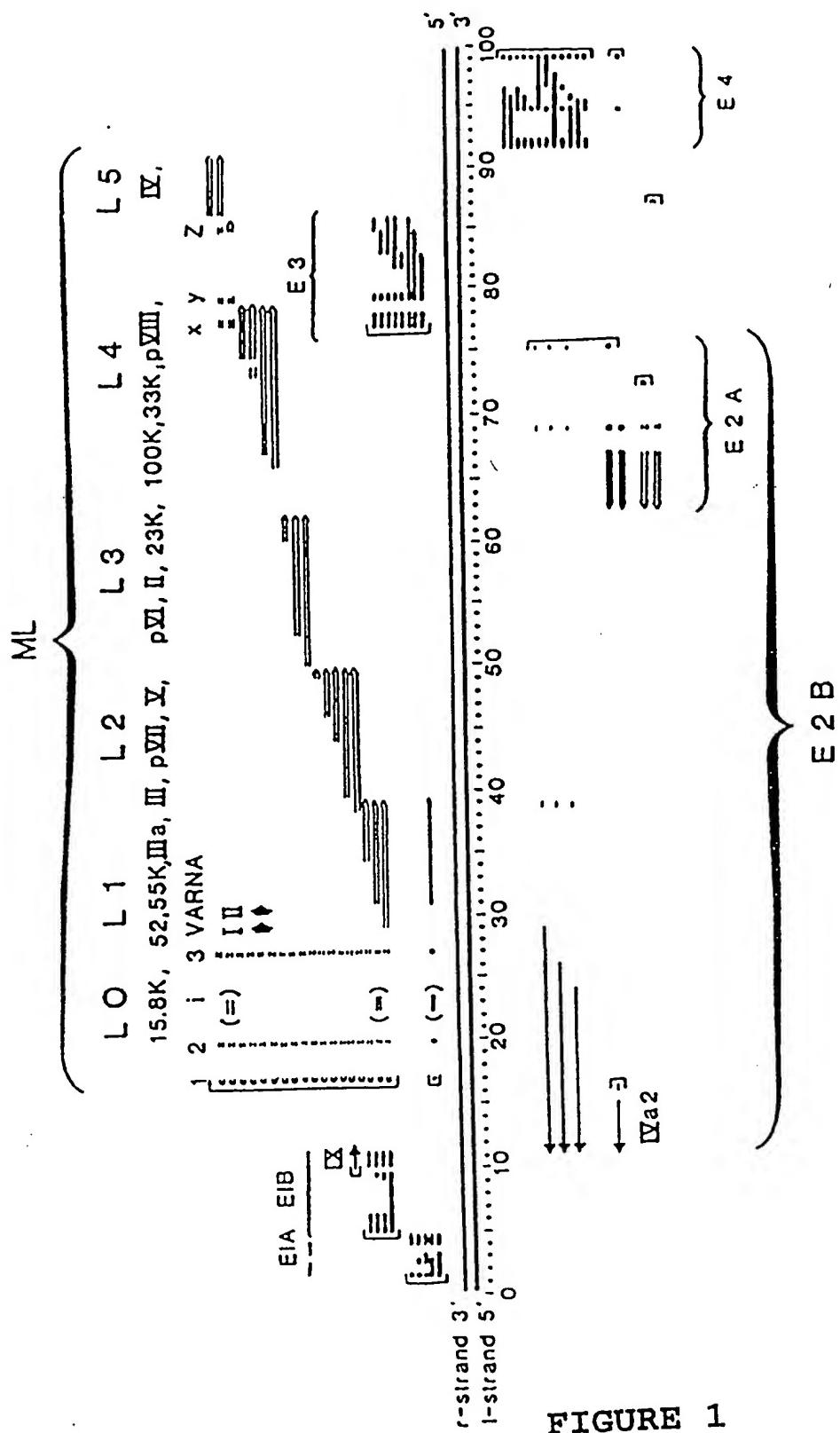


FIGURE 1

2/11

pTG6546

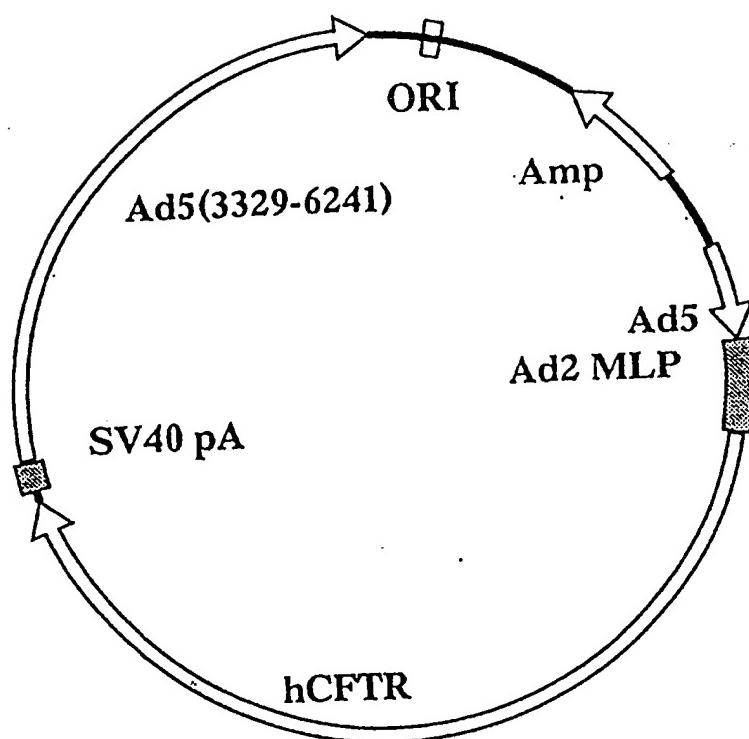


FIGURE 2

3 / 11

pTG6581

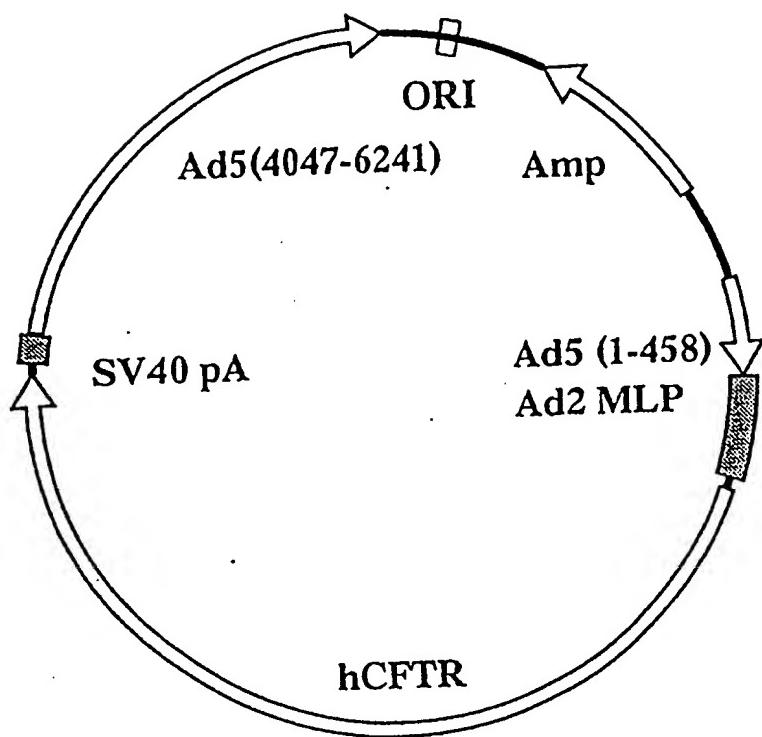
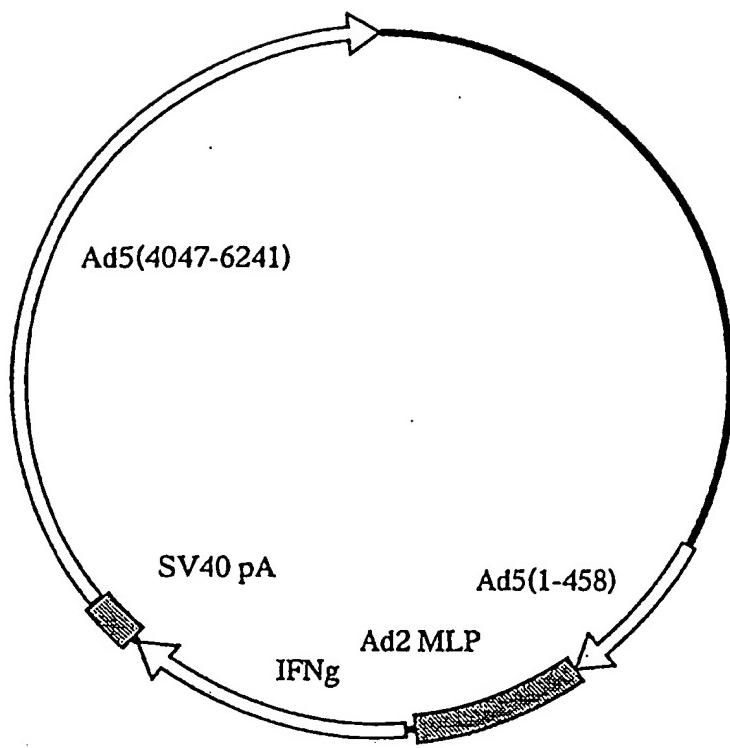


FIGURE 3

4 / 11

pTG6303**FIGURE 4**

5 / 11

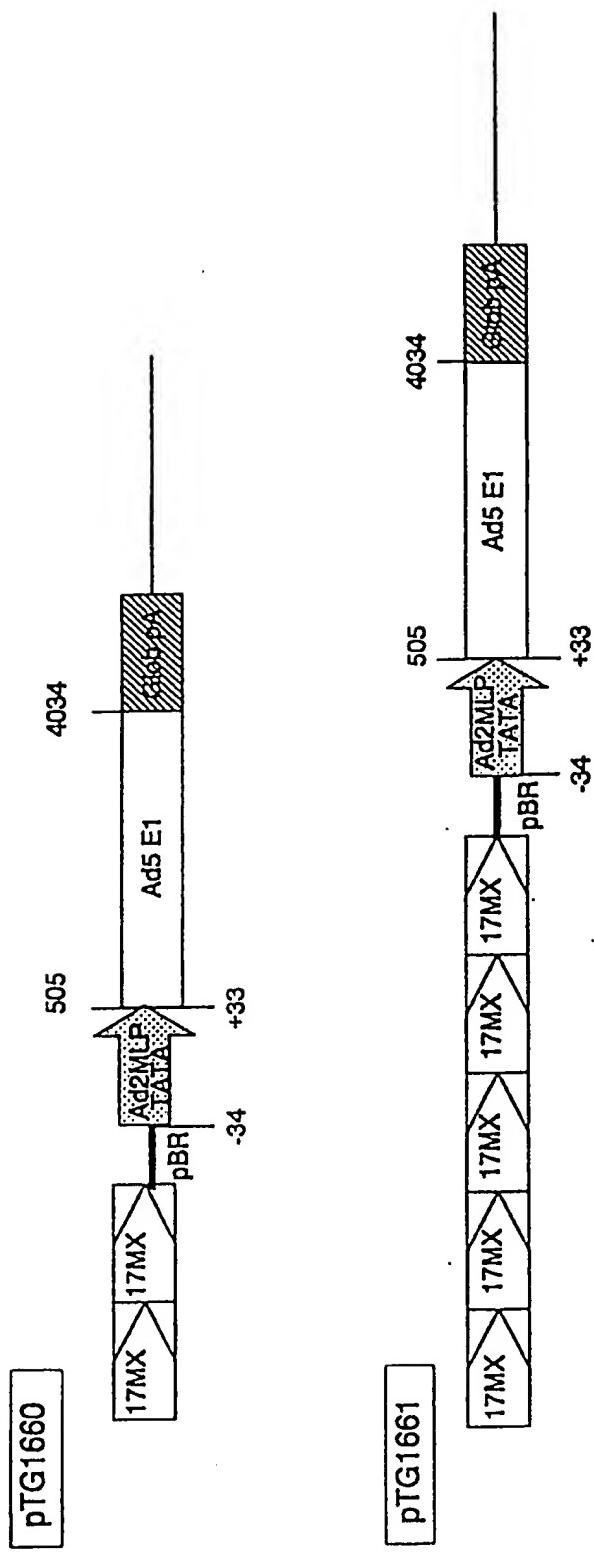


FIGURE 5

6 / 11

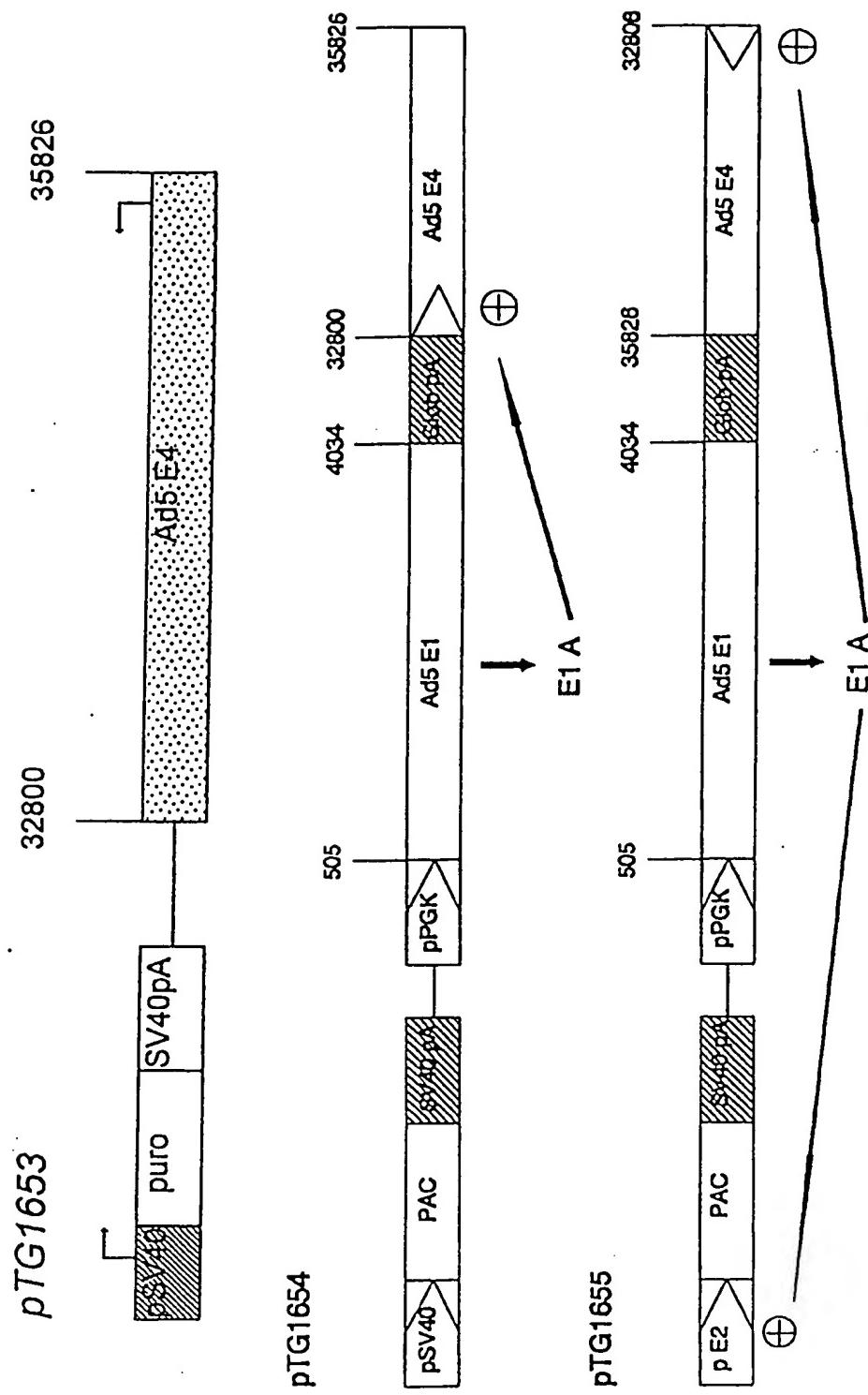


FIGURE 6

7 / 11

pTG5913

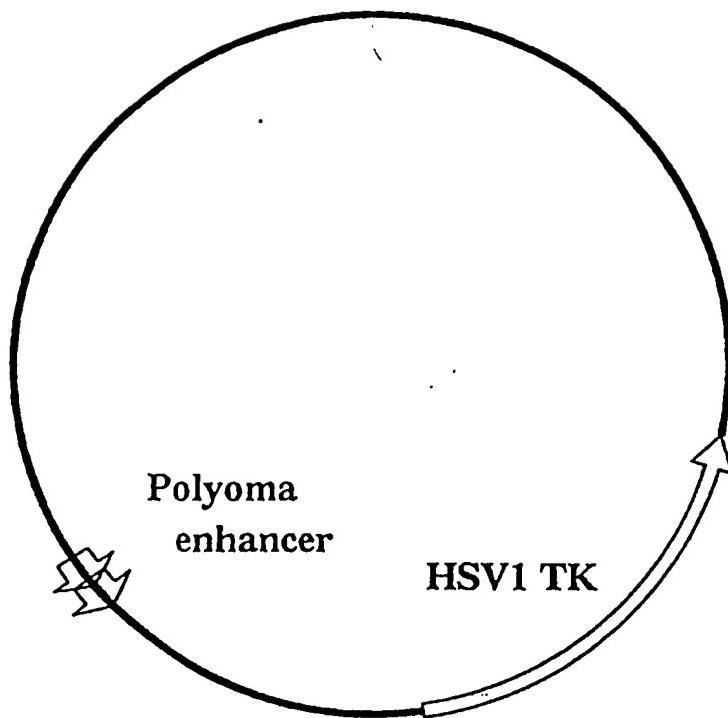


FIGURE 7

8 / 11

pTG8512

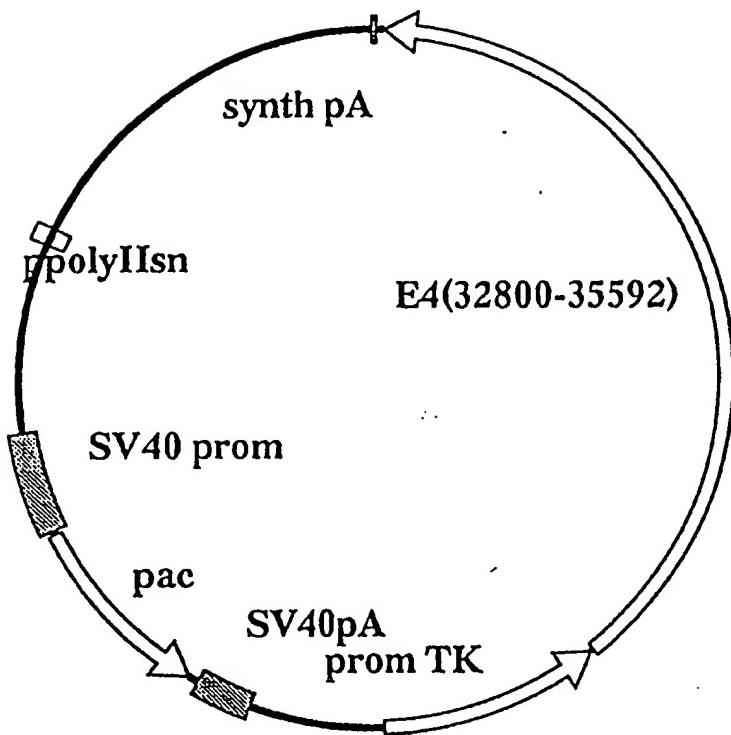


FIGURE 8

9 / 11

pTG8513

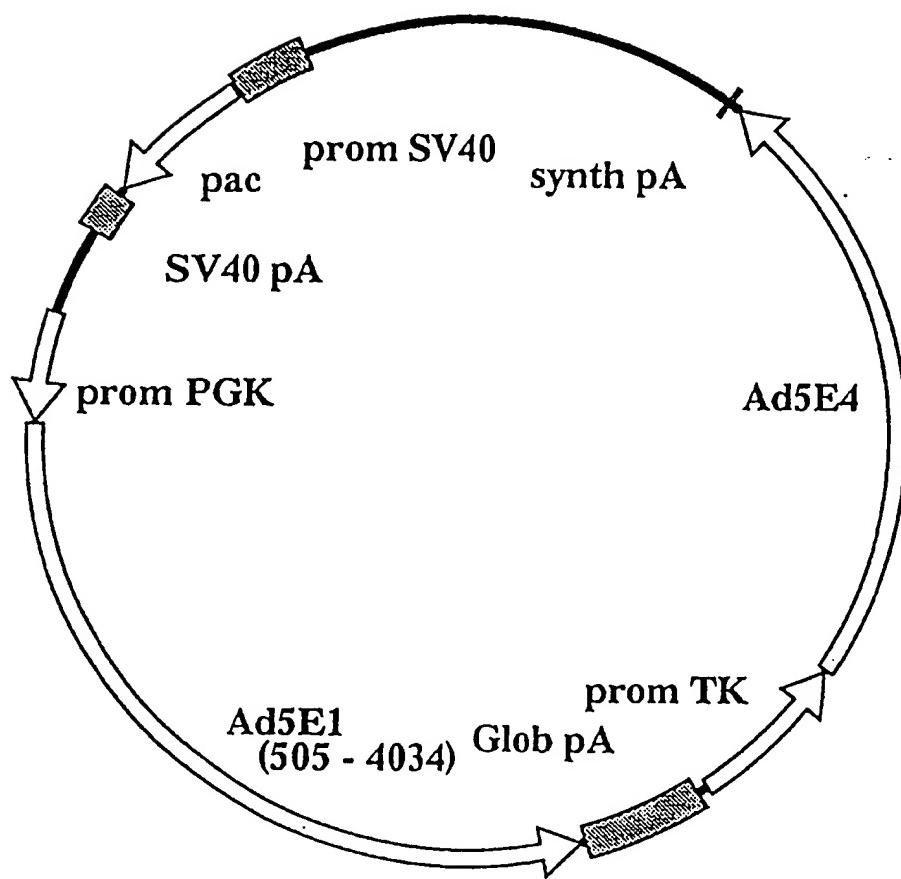


FIGURE 9

10/11

pTG8514

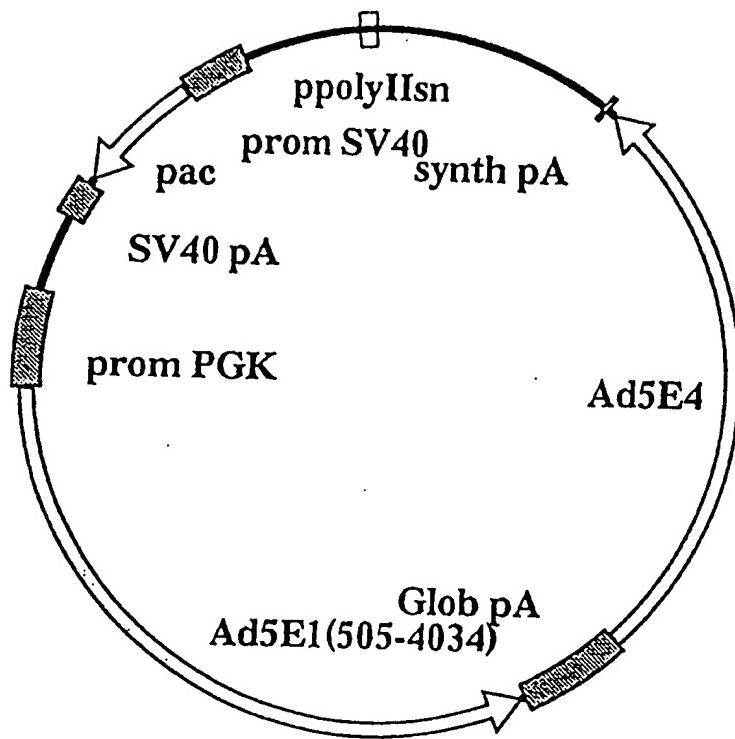


FIGURE 10

11/11

pTG8515

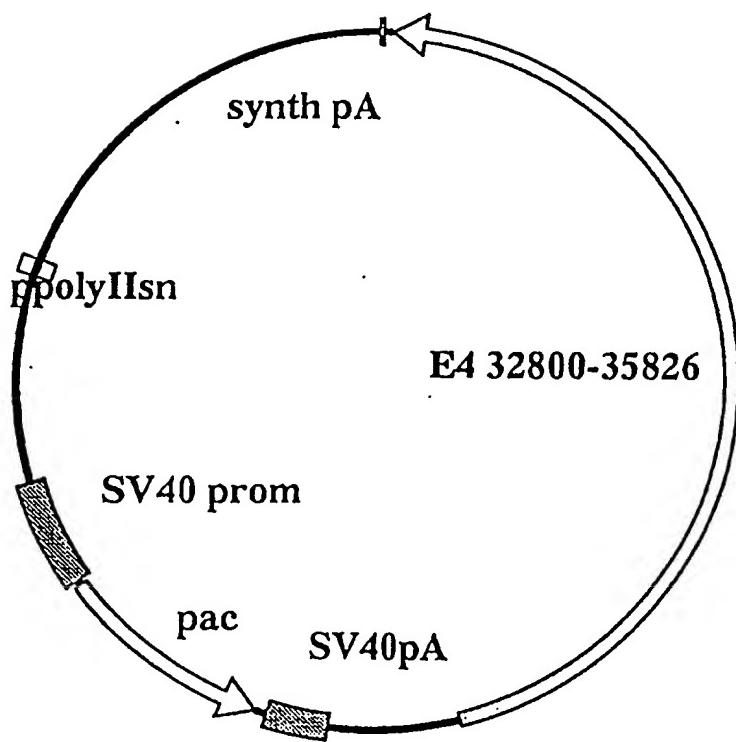


FIGURE 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 94/00624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 5	C12N15/86	C12N15/34	C12N5/10	A61K48/00	C12N15/12
	C12N7/04	C12N15/23	A61K39/235	C12N15/31	

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, June 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2F requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' see page 2715, column 2, line 53 - line 54 see page 2716, column 1, line 6 - line 9 ---	1,2
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219, 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' see page 58, paragraph 6 ---	1
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *B* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 August 1994	05.09.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentzaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 94/00624

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CELL. vol. 68, no. 1 , 10 January 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 143 - 155</p> <p>ROSENFIELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the airway epithelium' see the whole document</p> <p>---</p>	9-11
A	<p>WO,A,93 06223 (CNRS) 1 April 1993 see claim 3</p> <p>---</p>	1
E	<p>WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 June 1994</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p>	1-10,15, 24,26, 27, 30-32, 42,43, 46,49, 50,52-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00624

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claim 54 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the research has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition)

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Int'l Application No.
PCT/FR 94/00624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786 AU-A- 2790292 EP-A- 0559884 JP-T- 6502771	02-04-93 27-04-93 15-09-93 31-03-94
----- WO-A-9412649	09-06-94	NONE	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. Internationale No
PCT/FR 94/00624

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 5 C12N15/86 C12N15/34 C12N5/10 A61K48/00 C12N15/12					
C12N7/04 C12N15/23 A61K39/235 C12N15/31					

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6 , Juin 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2F requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' voir page 2715, colonne 2, ligne 53 - ligne 54 voir page 2716, colonne 1, ligne 6 - ligne 9 ----- -----</p>	1, 2

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou être utilisé pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

1 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 Août 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.09.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. Internationale No
PCT/FR 94/00624

C(uite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' voir page 58, alinéa 6 ----	1
A	CELL. vol. 68, no. 1 , 10 Janvier 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 143 - 155 ROSENFIELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the airway epithelium' voir le document en entier ----	9-11
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 Avril 1993 voir revendication 3 ----	1
E	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 Juin 1994 voir le document en entier -----	1-10,15, 24,26, 27, 30-32, 42,43, 46,49, 50,52-55

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR94/00624

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Pour autant que la revendication 54 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition)
2. Les revendications n°^s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. Les revendications n°^s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^s:
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^s.

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

- Translation from the French -

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Office

[logo]

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED PURSUANT TO THE
PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification ⁵ : C12N 15/86, 15/34, 5/10; A61K 48/00; C12N 15/12, 7.04, 15/23; A61K 39/235; C12N 15/31	A1	(11) International disclosure No.: (43) International disclosure date:	WO 94 / 28152 December 8, 1994 (08.12.94)		
(21) International application number: PCT / FR94 / 00624		(74) Representative: WARCOIN, Jacques Cabinet Regimbeau 26, avenue Kleber, F-75116 Paris (FR).			
(22) International application date: May 27, 1994 (27.05.94)		(81) Designated contracting states: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CE, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)			
(30) Information regarding priority: 93 / 06482 May 28 1993 (28.05.93)	FR	<p>Published: <i>With the international research report.</i></p> <p><i>[rubber stamp in English:]</i> A.M.L. INFORMATION SERVICES P.O. Box 405, Corte Madera, CA 94976-0405 (415) 927-0340 • fax (415) 927-7250</p>			
(71) Applicant (<i>for all of the designated states except for the U.S.A.</i>): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).					
(72) Inventors; and					
(75) Inventors/Applicants (<i>for the U.S. only</i>): IMLER, Jean-Luc [FR/FR]; 5a, rue des Mineurs, F-67000 Strasbourg (FR). METHALI, Majid [FR/FR]; 10, boulevard Tauler, F-67000 Strasbourg (FR). PAVIRANI, Andrea [FR/FR]; 13, avenue du General de Gaulle, F-67000 Strasbourg (FR).					
(54) Title: DEFECTIVE ADENOVIRUSES AND CORRESPONDING COMPLEMENTATION LINES <i>[please see the figure on the cover sheet of the French patent]</i>					
(57) Abstract <i>[please refer to the English-language abstract on the cover page of the French patent]</i>					

Best Available Copy

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY

The following codes are used to identify participating PCT states on the cover pages of the files
in which international applications pursuant to the PCT are published:

AT	Austria	GA	Gabon	MR	Mauritania
AU	Australia	GB	The United Kingdom	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgia	NE	Niger
BE	Belgium	GN	Guinea	NL	The Netherlands
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NO	Norway
BG	Bulgaria	HU	Hungary	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IR	Ireland	PL	Poland
BR	Brazil	IT	Italy	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Romania
CA	Canada	KE	Kenya	RU	The Russian Federation
CF	The Central African Republic	KG	Kirghizstan	SD	The Sudan
CG	The Congo	KP	The Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KR	The Republic of Korea	SI	Slovenia
CI	The Ivory Coast	KZ	Kazakhstan	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TG	Togo
CZ	The Czech Republic	LV	Latvia	TJ	Tadzhikistan
DE	Germany	MC	Monaco	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MD	The Republic of Moldova	UA	The Ukraine
ES	Spain	MG	Madagascar	US	The United States of America
FI	Finland	ML	Mali	UZ	Uzbekistan
FR	France	MN	Mongolia	VN	Viet Nam

DEFECTIVE ADENOVIRUSES AND CORRESPONDING COMPLEMENTATION LINES

The invention relates to new defective adenoviral vectors that allow the transfer and expression of genes of interest in a eukaryotic host cell or organism, and also relates to new complementation lines that complement, in *trans* mode, the essential viral functions that were deleted from the genome of these recombinant adenoviruses. The invention is of particular interest with regard to potential gene therapy, particularly in humans.

Adenoviruses are DNA viruses that have a broad host spectrum. They have been detected in many animal species and in many cell types. There are several serotypes, which differ particularly in terms of the sequence of their genomes. Most human adenoviruses are scarcely pathogenic, and generally cause only benign symptoms.

The adenovirus penetrates into the permissive host cell by means of a specific receptor, and is then internalized and passes into endosomes. Their acidification contributes to a change in the conformation of the virus and to its exit in the cytoplasm. Then the viral DNA associated with certain viral proteins that are necessary for the initial stages of the replication cycle penetrate into the nucleus of the infected cells, where its transcription is initiated by cell enzymes. The replication of the adenoviral DNA takes place in the nucleus of infected cells, and does not require cell replication. The aggregation of the new virions also takes place within the nucleus. Initially, the viral proteins are aggregated in such a way as to form empty capsids with an icosahedral structure, in which the adenoviral DNA is then encapsidated. The viral particles, or virions, are released from the infected cells, and are capable of infecting other permissive cells.

The infectious cycle of the adenovirus takes place in two stages, i.e.:

- The early stage, which precedes the initiation of the replication of the adenoviral genome, and which allows the production of the regulatory proteins that play a role in the replication and transcription of the viral DNA, and
- The late stage, which leads to the synthesis of the structural proteins.

Generally speaking, the adenoviral genome consists of a linear, bccatenated DNA molecule approximately 36 kb [kilobases] long, which contains the sequences that code for more than 30 proteins. At each of its ends, a short sequence is present that consists of 100 to 150 nucleotides, depending on the serotypes, which are inverted and known as ITRs (Inverted Terminal Repeats). The ITRs are involved in the replication of the adenoviral genome. The encapsidation region, which consists of approximately 300 nucleotides, is located at the 5' end of the genome, immediately after the 5' ITR.

The early genes are distributed among 4 regions, which are located at various points in the adenoviral genome and designated as the E1 through E4 regions (with the "E" standing for "early"). The early regions include at least six transcription units, which have their own promoters. The expression of the early genes is itself regulated, with certain genes being expressed before certain other genes. Three regions (i.e., the E1, E2, and E4 regions) are essential to viral replication. Thus, if an adenovirus is defective for one of these functions (that is, if the adenovirus cannot produce at least one protein coded by one of these regions), the protein in question must be provided to the adenovirus in *trans* mode.

The E1 early region is located at the 5' end of the adenoviral genome, and contains two viral transcription units, known as E1A and E1B, respectively. This region codes for the proteins that play a role very early in the viral cycle and that are essential to the expression of almost all the other genes in the adenovirus. In particular, the E1A transcription unit codes for a trans-activator protein for the transcription of the other viral genes, which in turn induces transcription starting with the promoters in the E1B, E2A, E2B, and E4 regions.

The products of the E2 region (which region likewise includes two transcription units, known as E2A and E2B) are directly involved in the replication of the viral DNA. In particular, this region governs the synthesis of a 72 kDa [kiloDalton] protein, which displays a high level of affinity for single-strand DNA and a polymerase DNA.

The E3 region is not essential for the replication of the virus. It codes for at least six proteins that would be responsible for the inhibition of the immune response of the host in the event of an infection by an adenovirus. In particular, the gp 19 kDa glycoprotein would interfere with the CTL response, which is responsible for the cytolysis of cells infected by the cytotoxic T-cells of the host.

The E4 region is located at the 3' end of the adenoviral genome. It codes for many polypeptides that are involved in the expression of late genes, in the stability of late messengers (mRNA), in the shift from the early stage to the late stage, and in the inhibition of cellular protein synthesis.

Once the replication of the viral DNA has been initiated, the transcription of the late genes begins. These genes occupy the majority of the adenoviral genome, and partially cover the transcription units for the early genes. But they are transcribed starting from different promoters and in accordance with an alternative splicing method, such that the same sequences are used for different purposes. Most of the late genes are transcribed starting from the promoter known as the MLP (Major Late Promoter). This promoter allows the synthesis of a long primary transcript, which is then matured into about twenty messenger RNAs, from which the capsidary proteins of the virion are produced. The gene that codes for the IX structural protein that forms the capsid is located at the 5' end of the adenoviral genome, and covers the E1B region at its 3' end. The transcription unit of the IX protein uses the same signal for the end of the transcription that the E1B transcription unit uses.

A number of adenoviruses have now been well characterized genetically and biochemically. This is the case for the human adenovirus type 5 (Ad5), whose sequence is disclosed in the Genebank data base under reference No. M73260. The various genes have been located accurately on the adenoviral genome, which includes, from 5' toward 3', the 5' ITR, which consists of 103 bp [base pairs], followed by the encapsidation region (as described by Hearing et al. in *J. Virol.*, Vol. 61 (1987), pp. 2555-2558), which consists of about 300 bp, and early and late regions (whose positions are indicated diagrammatically in Figure 1), and finally the 3' ITR.

It is clear from the foregoing observations that adenoviruses have interesting and worthwhile characteristics that make them the vector of choice for transferring genes of interest. Many recombinant adenoviruses have been described in the literature (e.g., by Rosenfeld et al. in *Science*, Vol. 252 (1991), pp. 431-343, and by Rosenfeld et al. in *Cell*, Vol. 68 (1992), pp. 143-155). Generally speaking, these recombinant adenoviruses are derived from Ad5 and are defective in terms of the E1 function, in order to prevent their dissemination in the environment and in the host organism. Moreover, the non-essential

E3 region may also be deleted. Exogenous sequences are integrated in the place of the E1 or E3 region.

Consequently, these defective adenoviruses can be propagated only in a cell line that complements, in *trans* mode, the E1 function that is essential for viral replication. At present, the only usable complementation line is the line of embryonic kidney cells known as the "293" cells (as described by Graham et al. in *J. Gen. Virol.*, Vol. 36 (1977), pp. 59-72) that results from the integration, into its chromosomes, of a fragment of the Ad5 genome that contains, in particular, the 5' end of the viral genome, such that the 293 line complements the adenoviruses that are defective for the E1 function. The 293 cells contain sequences that are also found in the defective recombinant adenovirus, such as the 5' ITR, the encapsidation region, and the 3' part of the E1B region that contains sequences that code for the early proteins.

The feasibility of gene transfer through the use of adenoviruses has now been established. However, the question of their innocuousness remains open. In fact, they are capable of transforming certain cell lines in culture. This capability indicates the potentially oncogenic power of some of the expression products for the adenoviral genome, essentially in the E1 region and probably also in the E4 region, at least for certain serotypes. There is also the non-negligible probability of a genetic recombination between a defective adenovirus of the type known in the prior art, particularly a recombinant adenovirus, and a natural or wild adenovirus (i.e., an adenovirus arising from an accidental contamination or an opportunistic infection of a host organism), as well as the equally non-negligible probability that a fragment of adenoviral genome will be integrated into the 293 complementation line. In fact, only one recombinant event is necessary in order to restore the E1 function and to generate a non-defective recombinant adenovirus that can disseminate itself throughout the environment. The possibility can also be envisioned that a natural wild adenovirus that co-infects the same cell as a defective adenovirus could complement the latter adenovirus in terms of the E1 function, thereby leading to a co-diesmination of both of the viruses. Finally, certain types of eukaryotic cells produce proteins that have an E1A-like activity and that are similarly capable of partially complementing the defective adenoviruses that infect them.

Therefore, it is desirable to have functioning adenoviral vectors that involve a minimal risk, with a view toward their use in gene therapy in order to correct, *in vivo*, genetically severe defects and in order to treat certain diseases for which no therapeutically effective

approaches are available. The success of gene therapy, as applied to humans, depends on the acquisition of such functioning adenoviral vectors.

Furthermore, there are certain questions with regard to the acquisition of the 293 cell line. The nature of these questions may be such as to compromise the acceptability of products that are derived from this cell line and that are intended for human use. It would be useful to have complementation lines whose origin and history are thoroughly known, in order to produce recombinant adenovirus particles intended for human use.

The following items have now been found:

- 1) New defective adenoviral vectors, from which certain specific regions of the adenoviral genome have been deleted, and which are better suited to the *in vivo* transfer of an exogenous nucleotide sequence; and
- 2) New complementation lines, characterized by the fact that they are pharmaceutically acceptable and therefore offer all of the safety characteristics required for the production of products intended for human use.

The value of these new vectors is that they have an increased cloning capability that allows the insertion of one or more large-sized genes of interest and maximum safety during use. The deleterious mutations make these adenoviruses incapable of autonomous replication and cell transformation, and do so without affecting the ability of these adenoviruses to transfer and express a gene of interest.

Thus, the present invention relates to an adenoviral vector that is replicatively defective; that can be encapsidated in a complementation cell; and that is derived from the genome of an adenovirus that includes, from 5' to 3', a 5' ITR, an encapsidation region, an E1A region, an E1B region, an E2 region, an E3 region, an E4 region, and a 3' ITR, through the deletion of:

- (i) Part or all of the E1A region, and all of the part of the E1B region that codes for early proteins; or
- (ii) Part or all of the E1A region and part or all of at least one region selected from among the E2 and E4 regions; or

(iii) Part or all of the E1A region and part of the encapsidation region.

As used in the present invention, the term "deletion" or "deprived" refers to the removal of at least one nucleotide in the target region. Naturally, this removal can involve a continuous or discontinuous deletion. The phrase "part or all" refers to either the entirety of the region in question or only a portion of it. Preference is given to deletions that prevent the production of at least one expression product coded by the said region. Thus, the deletions can be located in a region that codes or in a region that regulates, such as the promoter region, and can involve at least one nucleotide in such a way as to destroy the reading frame of a gene or to render a promoter region non-functional. The deletions may also consist of partial deletions or one or more genes in the region in question, or the deletion of the entirety of the region.

An adenoviral vector in accordance with the invention is defective for replication, but is capable of being replicated and encapsidated in a complementation cell that provides it, in *trans* mode, with the product or products for which it is defective, in order to generate an adenoviral particle (which is still referred to as a "defective adenovirus") that is incapable of autonomous replication in a host cell but that is nevertheless infectious, because it has the ability to deliver the vector into a host cell.

In accordance with a first variant, an adenoviral vector in accordance with the invention is derived from the genome of a natural or wild adenovirus through the deletion of part or all of the E1A region and of the E1B region that contain the entirety of the sequences that code for the early proteins. In a preferred embodiment, the invention relates to the promoter and to the sequences that code for the expression product of the E1B region (i.e., the early proteins), and does not include part or all of the termination signal for the transcription procedure that covers the sequences that code for the IX late protein.

In terms of an adenoviral vector in accordance with the invention that is derived from a human adenovirus type 5, the said deletion includes at least the sequences located between nucleotides 1634 and 3509 on the adenoviral genome whose sequence is disclosed in the Genebank data base under reference No. M73260. The purpose of this deletion is to reduce or remove the sequences that are common to an adenoviral vector in accordance with the invention and the fragment of the adenoviral genome that is integrated within a complementation line, such as the 293 line. Furthermore, it removes,

from an adenoviral vector in accordance with the invention, sequences whose expression products are potentially oncogenic, at least in conjunction with the expression products of the E1A region.

Furthermore, an adenoviral vector in accordance with the invention may also be derived from the genome of a natural or wild adenovirus through the deletion of part or all of:

- (i) The E3 region; and/or
- (ii) The E2 region; and/or
- (iii) The E4 region.

Naturally, an adenoviral vector in accordance with the invention may include any one of the three types of deletions described above, or any two of them, in accordance with any combinations, or may even include all three of these types of deletions.

In accordance with a particularly advantageous embodiment, an adenoviral vector in accordance with the invention is deprived of only part of the E3 region, and preferably of the part that does not contain the sequences that code for the gp 19 kDa protein. The presence of the sequence that codes for the gp 19 kDa protein in an adenoviral vector in accordance with the invention will allow the infected cells to escape notice by the immunosurveillance of the host – an important criterion when the therapeutic protocol calls for several repeated administrations. The sequences that code for gp 19 kDa are preferably placed under the control of appropriate elements that allow their expression in the host cell, i.e., the necessary elements for the transcription of the said sequences into mRNA and the conversion of the latter into protein. These elements are particularly characteristic of a promoter. Such promoters are well known to those skilled in the art, and are inserted upstream of the said coding sequence, through the use of standard techniques in genetic engineering. The selected promoter should preferably be a constituent promoter that cannot be activated by one of the expression products of the E1A region. Examples of such promoters include the promoter for the HMG (hydroxy-methyl-glutaryl coenzyme A reductase) gene; the early promoter of the SV40 (simian virus 40) virus; the LTR (Long Terminal Repeat) of RSV (Rous Sarcoma Virus); or the promoter of a PGK (phospho-glycerate kinase) gene among the upper Eukaryotes.

Furthermore, an adenoviral vector in accordance with the invention may optionally be deprived of the portion of the E3 region that corresponds to the promoter region, which

will be replaced by a heterologous promoter region, such as one of the ones mentioned above.

In accordance with a second variant, an adenoviral vector in accordance with the invention is derived from a natural or wild adenovirus through the continuous or discontinuous deletion of part or all of the E1A region and of part or all of at least the E2 and/or E4 region. Such a deletion makes it possible to increase the options for the cloning of genes of interest. Furthermore, eliminating part or all of the E4 region also makes it possible to reduce or remove the sequences that code for potentially oncogenic products.

As noted above, an adenoviral vector in accordance with the invention may also be deprived of part or all of the E1B and/or E3 region, particularly in accordance with an embodiment such as the one mentioned above (such as the deletion of the part of the E1B region that includes all of the sequences that code for the early proteins, and the part of the E3 region that does not code for the gp 19 kDa protein).

Finally, in accordance with a third variant, an adenoviral vector in accordance with the invention is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E1A region and of part of the encapsidation region.

A partial deletion of the encapsidation region makes it possible to achieve a significant reduction in the probability of the uncontrolled dissemination of an adenoviral vector in accordance with the invention when the latter is in the presence of a wild adenovirus. Such a deletion makes it possible to allocate the encapsidation functions of the adenoviral vector in accordance with the invention in such a way that even in the event of the complementation, in *trans* mode, of the defective function of the adenoviral vector in accordance with the invention by a wild adenovirus, the adenoviral vector in accordance with the invention cannot be effectively encapsidated in relation to the genome of the competing wild adenovirus.

The deletions of the encapsidation region should be selected on the basis of two criteria, i.e., a reduced ability to be encapsidated, along with a residual level of effectiveness that is compatible with industrial production. In other words, the encapsidation function of an adenoviral vector in accordance with the invention should be substantially preserved, but to a lesser degree. The level of attenuation may be determined in accordance with

conventional methods involving titration through the infection of a suitable line and an evaluation of the number of lysis areas. Such methods are known to those skilled in the art. Within the scope of the invention, encapsidation efficiency is reduced by a factor of 2 to 50, advantageously by a factor of 3 to 20, and preferably by a factor of 5 to 10 in relation to a control adenovirus that has a wild-type encapsidation region.

Naturally, an adenoviral vector in accordance with the invention may also involve at least one, or any combination, of the deletions described above.

An adenoviral vector in accordance with the present invention is derived from the genome of a natural or wild adenovirus; advantageously of a canine, avian, or human adenovirus; and preferably of a human adenovirus type 2, 3, 4, 5, or 7; and, in accordance with a supremely preferably embodiment of the invention, of a human adenovirus type 5 (Ad5). In the latter case, the deletions performed in order to obtain the adenoviral vector in accordance with the invention are indicated with reference to the position of the nucleotides of the genome of the Ad5 specified in the Genebank data base under reference No. M73260.

Most particularly, an adenoviral vector in accordance with the invention is preferred that is derived from a human adenovirus type 5, through the deletion:

- (i) Of all of the part that codes for the early proteins in the E1B region, starting at nucleotide 1634 and ending at nucleotide 4047; and/or
- (ii) Of the E3 region extending from nucleotide 32800 to nucleotide 35826; and/or
- (iii) Of the part of the E3 region extending from nucleotide 27871 to nucleotide 30748; and/or
- (iv) Of the part of the encapsidation region that:
 - Extends from nucleotide 270 to nucleotide 346; or
 - Extends from nucleotide 184 to nucleotide 273; or
 - Extends from nucleotide 287 to nucleotide 358.

An adenoviral vector in accordance with the invention is derived from the genome of a wild or natural adenovirus through the deletion of at least 18 percent of the said genome; of at least 22 percent; of at least 30 percent; of at least 40 percent; of at least 50 percent; of at least 60 percent; of at least 70 percent; of at least 80 percent; of at least 90 percent; or even of at least 95 percent, and particularly of 98.5 percent [of the same genome].

In accordance with a particularly preferred embodiment, an adenoviral vector in accordance with the invention is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of the entirety of the adenoviral genome except for the 5' and 3' ITRs, and [through the deletion] of part or all of the encapsidation region. In accordance with this variant, the adenoviral vector in accordance with the invention contains only a minimal number of viral sequences, in order to limit the risks of recombination and the risks of oncogenicity, and in order to have a maximal cloning capability. Thus, we shall refer to a so-called "minimum" adenoviral vector, into which it will then be possible to insert up to 30 kb of exogenous nucleotide sequences. A preferred adenoviral vector in accordance with the invention is derived from a human adenovirus type 5 through the deletion of the part of the viral genome extending from nucleotide 459 to nucleotide 35832.

Within the context of the present invention, the purpose of an adenoviral vector in accordance with the invention is to transfer and express an exogenous nucleotide sequence in a host cell. The term "exogenous nucleotide sequence" refers to a nucleic acid that includes coding sequences and regulatory sequences that allow the expression of the said coding sequences, and in which the coding sequences are sequences that are not normally present in the genome of an adenovirus. The regulatory sequences may be of any origin. The exogenous nucleotide sequence is introduced into an adenoviral vector in accordance with the invention through conventional genetic engineering methods, between the encapsidation region and the 3' ITR.

An exogenous nucleotide sequence may consist of one or more genes that are of interest and preferably that are of therapeutic interest. Within the context of the present invention, a gene of interest may code for an antisense RNA or for an mRNA that will then be transformed into a protein of interest. A gene of interest may be of the genomic type, of the complementary DNA (cDNA) type, or of the mixed type (i.e., a minigene, in which at least one intron is deleted). It may code for a mature protein, for a precursor of a mature protein (and particularly for a precursor that is intended to be secreted and that therefore includes a signal peptide), for a chimerical protein arising from the merging

of a sequence having a different origin, or for a mutant of a natural protein that displays improved or modified biological properties. Such a mutant may be obtained through the mutation, deletion, substitution, and/or addition of one or more nucleotides of the gene that codes for the natural protein.

A gene of interest may be placed under the control of appropriate elements for its expression in a host cell. The term "appropriate elements" refers to the set of elements necessary for its transcription into RNA (antisense RNA or mRNA) and for the conversion of an mRNA into protein. Among the necessary elements for transcription, the promoter is particularly important. It may consist of a constituent promoter or of a promoter that can be regulated, and it may be isolated from any gene of eukaryotic or viral origin, or even a gene of adenoviral origin. Alternatively, it may involve a natural promoter for the gene of interest in question.

Generally speaking, as promoter used in the present invention may be modified in such a way that it contains regulatory sequences. For example, a gene of interest being used in the present invention is placed under the control of the promoter for immunoglobulin genes when the intention is to target its transfer into lymphocyte host cells. Mention may also be made of the promoter for the TK-HSV-1 gene (thymidine kinase for the Type 1 herpes [simplex] virus), or the adenoviral MLP promoter, particularly for a human adenovirus type 2, which allows expression in a large number of cell types.

The genes of interest that can be used within the context of the present invention include the ones listed below.

- Genes that code for cytokines, such as alpha interferon, gamma interferon, and the interleukins;
- Genes that code for membranal receptors, such as the receptors that are recognized by pathogenic organisms (e.g., viruses, bacteria, or parasites), and preferably by the HIV (human immunodeficiency virus) virus;
- Genes that code for coagulation factors, such as Factor VIII and Factor IX;
- The gene that codes for dystrophin;

- The gene that codes for insulin;
- Genes that code for proteins that participate either directly or indirectly in ionic cellular channels, such as the CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) protein;
- Genes that code for antisense RNAs or for proteins that can inhibit the activity of a protein produced by a pathogenic gene that is present in the genome of a pathogenic organism, or by a cellular gene whose expression has become disordered (for example, an oncogene);
- Genes that code for a protein that inhibits an enzymatic activity, such as α 1-antitrypsin or an inhibitor of a viral protease;
- Genes that code for variants of pathogenic proteins that have been mutated in such a way as to alter their biological function, such as for example trans-dominant variants of the TAT protein of the HIV virus that can compete with the natural protein for the bond to the target sequence, thereby interfering with the activation of the HIV virus;
- Genes that code for antigenic epitopes, in order to increase the immunity of the host cell;
- Genes that code for proteins in the Class I and Class II major histocompatibility complex, and the genes that code for the inductor proteins for these genes;
- Genes that code for cellular enzymes or for enzymes that are produced by pathogenic organisms; and
- So-called "suicide" genes, including more particularly the TK HSV-1 suicide gene. The viral TK enzyme has a clearly greater affinity than the cellular TK enzyme for certain nucleoside analogs (such as acyclovir or gancyclovir). It transforms them into monophosphated molecules, which in turn can be transformed by the cellular enzymes into nucleotide precursors, which are toxic. These nucleotide analogs can be incorporated into DNA molecules during synthesis, and therefore primarily into the DNA of cells that are in the process of replicating. This incorporation makes it

possible to destroy specifically the cells, such as cancer cells, that are in the process of division.

The preceding list is not limitative, and other genes of interest may also be utilized within the context of the present invention.

Furthermore, in accordance with another embodiment of the invention, an adenoviral vector in accordance with the invention may also include a non-therapeutic gene that codes for a trans-activator protein for non-adenoviral transcription. Naturally, one should avoid the gene or genes in the E1A region that code for a trans-activator protein whose expression would pose the risk of rendering the adenovirus non-defective. The preferred choice will be the gene that codes for the *Saccharomyces cerevisiae* Gal4 protein. Its expression will allow the propagation of the vector in a complementation line such as the one described below. Such a line is more sophisticated and makes it possible to alleviate potential toxicity problems caused by the continuous production of adenoviral complementation proteins. If necessary, the gene that codes for a trans-activator transcription protein may be placed under the control of appropriate elements for its expression, such as for example elements that allow the expression of a gene of interest.

The invention also relates to an adenoviral particle, as well as to a eukaryotic host cell that includes an adenoviral vector in accordance with the invention. The said cell is advantageously a mammalian cell, and preferably a human cell. It may include the said vector in integrated form in the genome, or else, and preferably, in non-integrated form (i.e., in the form of an episome).

An adenoviral particle in accordance with the invention may be prepared by passage through all complementation lines that provide, in *trans* mode, the functions for which an adenoviral vector in accordance with the invention is defective, such as for example the 293 cell in the prior art. These preparation methods are known to those skilled in the art (see Graham and Prevec, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7 (1991), E.J. Murey, ed., The Human Press, Inc., pp. 109-128). As an option, an adenoviral particle in accordance with the invention may be generated in a complementation line in accordance with the invention as described below.

Thus, the present invention also relates to a complementation line that includes a complementation element that particularly includes part of the E1 region of the genome

of an adenovirus, with the exclusion of the 5' ITR. The said complementation element is capable of complementing, in *trans* mode, a defective adenoviral vector, and is either integrated into the genome of the said complementation line or inserted into an expression vector.

Within the context of the present invention, the term "complementation line" refers to a eukaryotic cell that can provide, in *trans* mode, the function or functions for which an adenoviral vector is defective. In other words, it is capable of producing the one or more proteins that are necessary for the replication and the encapsidation of the said adenoviral vector, such as early and/or late proteins that it [i.e., the defective adenoviral vector] cannot produce by itself, and that are necessary for the formation of a viral particle. Naturally, the said part may be modified through the mutation, deletion, and/or addition of nucleotides, provided that these modifications do not alter its complementation capability. Thus, an adenoviral vector that is defective for the E1 function should be propagated in a complementation line for E1 (i.e., one that is capable of providing, in *trans* form, the protein or the set of proteins coded by the E1 region that the vector cannot provide); a vector that is defective for the E1 and E4 functions should be propagated in a complementation line for E1 and E4 (i.e., a complementation line that can provide the necessary proteins that are coded by the E1 and E4 regions); and, finally, a vector that is effective for the E1, E2, and E4 functions should be propagated in a complementation line for these three functions. As noted in the introduction, the E3 region is non-essential, and does not need to be completed specifically.

A complementation line in accordance with the invention may be derived either from an line of immortalized cells, which can divide themselves indefinitely, or from a primary line. In accordance with the desired goals of the present invention, a complementation line in accordance with the invention is useful for the encapsidation of any defective adenoviral vector, and, in particular, for the encapsidation of a defective adenoviral vector in accordance with the invention. Thus, when the term "defective adenoviral vector" is used hereinafter, it should be understood as referring to any defective vector, either in the prior art or in the present invention.

The term "complementation element" refers to a nucleic acid that includes at least the part of the adenoviral genome that is utilized within the context of the present invention. It may be inserted in a vector, for example of the plasmid type, or of the viral type, for example retroviral, adenoviral, or derived from a pox virus. Nevertheless, preference

is given to the case in which it is integrated into the genome of a complementation line in accordance with the invention. The methods for introducing a vector or a nucleic acid into a cell line, and optionally integrating it into the genome of a cell, constitute conventional techniques that are well known to those skilled in the art, in the same way as the vectors that can be utilized for similar purposes. The complementation element may be introduced into a complementation line in accordance with the invention, either beforehand or at the same time as a defective adenoviral vector.

In accordance with a specific embodiment, a complementation line in accordance with the invention is intended to complement, in *trans* mode, an adenoviral vector that is defective for the E1 function. Such a line has the advantage of reducing the risks of recombination, because, unlike the conventional 293 cell line, it has been deprived of the 5' ITR that is present in the vectors.

Within the context of the present invention, a complementation line in accordance with the invention may include part or all of the E1A region of the genome of an adenovirus and:

- (i) Part or all of at least one region of the adenoviral genome selected from among the E1B, E2, and E4 regions; or
- (ii) Part or all of at least two of the E1B, E2, and E4 regions of the said genome;
or
- (ii) Part or all of the E1B, E2, and E4 regions of the said genome.

Within the context of the present invention, if necessary the said regions may be placed under the control of appropriate elements that allow their expression. However, the said regions are preferably placed under the control of their own promoter, which can be induced by the trans-activator protein that stimulates transcription, as coded by the E1A region.

As an example, a complementation line in accordance with variant (ii) above, including the E1A, E1B, and E4 regions, is intended for use in the preparation of an adenovirus that

is defective for the E1 and E4 functions and that has been deprived of part or all of the corresponding regions.

In accordance with an advantageous embodiment, a complementation line in accordance with the invention includes particularly part or all of the E1A region and all of the sequences that code for the early proteins in the E1B region.

Furthermore, in accordance with a variant of this embodiment, a complementation line in accordance with the invention may also be deprived of the promoter region for the E1A region. In such a case, the part of the adenoviral genome that codes for the early proteins in the said E1A region will be placed under the control of an appropriate heterologous promoter that is functional in the said complementation line. It may be isolated from any eukaryotic or viral gene. However, recourse to an adenoviral promoter in an early region should be avoided, [because] it may involve a constituent promoter. Typical examples include the promoters for the SV40 virus, for the TK HSV-1 gene, and for the murine PGK gene.

In accordance with an alternative embodiment, the selected promoter may be regulatable, and advantageously may be inducible by a trans-activator protein for non-adenoviral transcription. It may involve a promoter isolated from a naturally inducible gene, or else any promoter that has been modified through the addition of activation sequences (referred to as "UASs", for "Upstream Activating Sequences") that respond to the said trans-activator protein. More specifically, it is preferably to utilize a promoter that is inducible by the Gal4 protein of *Saccharomyces cerevisiae*, and, preferably, a hybrid promoter consisting of a so-called "minimum" promoter that contains only the initiation sequences for the transcription (i.e., the TATA box and the initiation site) of any gene (such as for example the TK HSV-1 gene or the Ad2 MLP gene), upstream of which has been inserted at least one sequence for activation of the Gal10* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (as described by Webster et al., in *Cell*, Vol. 52 (1988), pp. 169-178).

* [TRANSLATOR'S NOTE: Sic. The Webster reference, which deals primarily with the GAL4 protein, makes no mention of the Gal10 gene.]

The latter sequence may be synthesized chemically or isolated from the Gal10 gene, in accordance with conventional genetic engineering methods. Thus, the hybrid promoter will be activated, and will induce the expression of the genes that are coded by the E1A region and that have been placed under its control, only in the presence of the Gal4

protein. Then, the expression products of the E1A region may in turn induce the expression of the other early E1B, E2, and/or E4 regions, which may be included in a complementation line in accordance with the invention. This particular embodiment of the invention avoids the constitutive (and potentially toxic) production of the adenoviral proteins that are necessary for the complementation procedure. Thus, induction can be triggered in the presence of a defective adenoviral vector in accordance with the invention that expresses the Gal4 protein. However, such a line may also be used to prepare any defective adenoviral vector, provided of course that the Gal4 protein is provided in *trans* mode. The methods of providing a protein in *trans* mode are known to those skilled in the art.

Generally speaking, a complementation line includes part of the genome of an adenovirus that is advantageously derived from an animal adenovirus, such as a canine or avian adenovirus, or, preferably, a human virus, and, most particularly, a human adenovirus type 2 or type 5.

A complementation line in accordance with the invention particularly includes the part of the genome of a human adenovirus type 5 that extends:

- (i) From nucleotide 100 to nucleotide 5297 in the sequence disclosed in the Genebank data base under reference No. M73260; or
- (ii) From nucleotide 100 to nucleotide 4034; or
- (iii) From nucleotide 505 to nucleotide 4034.

The portion of the genome in accordance with item (ii) above is advantageously inserted upstream of a signal for the termination of the transcription, such as for example the polyadenylation signal in the SV40 (simian virus 40) virus or in the β -globin gene in the rabbit. Then the part in accordance with item (iii) above, which includes neither the promoter sequences for the E1A region or the signal for the termination of the transcription of the E1B region, is placed under the control of an appropriate promoter (particularly of a promoter that is inducible by the Gal4 protein), and of a signal for the termination of the transcription, such as for example the signal in the β -globin gene in the rabbit. Such a complementation line is considered to be particularly reliable, because it

has been deprived of a majority of the sequences that it has in common with a defective adenovirus.

On the other hand, a complementation line in accordance with the invention may include the part of the E4 region of a human adenovirus type 5 that starts at nucleotide 32800 and ends at nucleotide 35826 in the sequence disclosed in the Genebank data base under reference No. M 73260.

Furthermore, a complementation line in accordance with the invention may include the entire genome of a natural adenovirus, except for the encapsidation region and the 5' and 3' ITRs, and, in an altogether preferable manner, the part of the genome of a human adenovirus type 5 that starts at nucleotide 505 and ends at nucleotide 35826 in the sequence disclosed in the Genebank data base under reference No. M 73260. For the purposes of the present invention, the latter [part of the genome] is then placed under the control of an appropriate promoter. Recourse should preferably be had to a promoter that is inducible by the Gal4 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Such a line will make it possible to complement, in *trans* mode, all of the functions that are essential to the replication and encapsidation of an adenoviral vector that is defective for the E1, E2, and E4 functions, and particularly of a minimal adenoviral vector in accordance with the invention.

In accordance with a preferred embodiment, a complementation line in accordance with the invention may include a complementation element that also includes a gene that codes for a selection marker that enables the detection and isolation of the cells that contain it. Within the context of the present invention, this gene may involve any gene that codes for a selection marker (the latter being generally known to those skilled in the art). This gene may advantageously involve a gene that provides resistance to antibiotics, and preferably involves the gene that codes for puromycin acetyl-transferase (i.e., the pac gene) and that provides resistance to puromycin.

Within the context of the present invention, the gene that codes for a selection marker may be placed under the control of appropriate elements that allow its expression. Such an element may involve a constitutive promoter, such as the early promoter for the SV40 virus. However, preference should be given to a promoter that is inducible by the trans-activator protein that is coded by the E1A region, and particularly the E2A adenoviral promoter. Such a combination will introduce a selection pressure for the maintenance of

the expression of the genes from the E1A region in a complementation line in accordance with the invention. For the purposes of the present invention, the selected promoter may be modified through the deletion, mutation, substitution, and/or addition of nucleotides.

In accordance with a supremely preferred embodiment, a complementation line in accordance with the invention is derived from a pharmaceutically acceptable cell line. The term "pharmaceutically acceptable cell line" refers to a cell line that is characterized (i.e., whose origin and history are known), and/or to a cell line that has already been used in the large-scale production of products intended for human use (e.g., the creation of lots for advanced clinical trials or lots intended for sale). Such lines are available through organizations such as the ATCC [American Type Culture Collection]. In this regard, mention may be made of the Vero line from the kidneys of African green monkeys; the BHK line from the kidneys of golden or Syrian hamsters; the A549 human line derived from a lung carcinoma; the MRC5 human pulmonary line; the W138 human pulmonary line; and the CHO line from the ovaries of Chinese hamsters.

As an alternative, a complementary line in accordance with the invention may be derived from primary cells, and particularly from retinal cells taken from human embryos.

The invention also relates to a procedure for the preparation of an adenoviral particle in accordance with the invention. This procedure is characterized by the fact that it consists of the following steps:

- (i) An adenoviral vector in accordance with the invention is introduced into a complementation line that is capable of complementing the said adenoviral vector in *trans* mode, so that a transfected complementation line is obtained;
- (ii) The said transfected complementation line is cultivated under appropriate conditions for allowing the production of the said adenovirus particle; and
- (iii) The said adenovirus particle is recovered in the cell culture.

Naturally, the adenoviral particle can be recovered from the supernatant fraction of the culture, as well as from the cells in accordance with the conventional procedures.

A procedure in accordance with the invention preferably involves the implementation of a complementation line in accordance with the invention.

The invention also relates to the therapeutic or prophylactic use of an adenoviral vector, an adenovirus particle, a eukaryotic host cell, or a complementation line in accordance with the invention.

Finally, the present invention relates to a pharmaceutical composition containing, as a therapeutic or prophylactic agent, an adenoviral vector, an adenovirus particle, a eukaryotic [host] cell, or a complementation line in accordance with the invention, in association with a pharmaceutically acceptable vehicle.

The composition in accordance with the invention is intended particularly for use in the preventive or curative treatment of diseases such as:

- Genetic diseases, such as hemophilia, mucoviscidosis, or Duchen[n]e and/or de Becker myopathy;
- Cancers, such as the ones induced by oncogenes or by viruses;
- Retroviral diseases, such as AIDS (acquired immune deficiency syndrome, as acquired as a result of infection with the HIV virus); and
- Recurrent viral diseases, such as the viral infections caused by the herpes virus.

A pharmaceutical composition in accordance with the invention may be manufactured in accordance with a conventional procedure. In particular, a therapeutically effective quantity of a therapeutic or prophylactic agent is associated with a vehicle, such as a diluent. A composition in accordance with the invention can be administered by means of an aerosol or by means of any conventional administration method currently in use in the field, and particularly via the oral, subcutaneous, intramuscular, intravenous, intraperitoneal, intrapulmonary, or intratracheal methods of administration. The composition may be administered in the form of a single dose, or in the form of doses that are repeated one or more times after a certain amount of time has elapsed. The appropriate administration method and dosage will vary in accordance with various

parameters, such as for example the individual being treated, the disease to be treated, or even the gene or genes of interest to be transferred.

Generally speaking, a pharmaceutical composition in accordance with the invention will include a dose of the adenovirus in accordance with the invention in an amount between 10^4 and 10^{14} , advantageously in an amount between 10^5 and 10^{13} , and preferably in an amount between 10^6 and 10^{11} [no unit indicated – Tr.J]. A pharmaceutical composition, and particularly a pharmaceutical composition intended for prophylactic use, may also include a pharmaceutically acceptable adjuvant.

The invention also relates to a method of treatment in accordance with which a therapeutically effective quantity of an adenoviral vector, an adenoviral particle, a eukaryotic cell, or a complementation line in accordance with the invention is administered to a patient who requires such treatment.

The present invention is more completely described with reference to the following figures and with the aid of the following examples.

Figure 1 is a diagrammatic representation of the genome of the human adenovirus type 5 (represented in the form of arbitrary units ranging from 0 to 100), indicating the positioning of the various different genes.

Figure 2 is a diagrammatic representation of the pTG 6545 vector.

Figure 3 is a diagrammatic representation of the pTG 6581 vector.

Figure 4 is a diagrammatic representation of the pTG 6303 vector.

Figure 5 is a diagrammatic representation of the pTG 1660 and pTG 1661 vectors.

Figure 6 is a diagrammatic representation of the pTG 1653, pTG 1654, and pTG 1655 vectors.

Figure 7 is a diagrammatic representation of the pTG 5913 vector.

Figure 8 is a diagrammatic representation of the pTG 8512 vector.

Figure 9 is a diagrammatic representation of the pTG 8513 vector.

Figure 10 is a diagrammatic representation of the pTG 8514 vector.

Figure 11 is a diagrammatic representation of the pTG 8515 vector.

[TRANSLATOR'S NOTE: The eight examples appear in the accompanying file.]

SEQUENCE LIST

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: TRANSGENE
- (B) STREET ADDRESS: 11, rue de Molsheim
- (C) CITY: STRASBOURG
- (E) *[sic]* COUNTRY: FRANCE
- (F) POSTAL CODE: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 88.27.91.00
- (H) FAX: (33) 88.22.58.07

(ii) TITLE OF THE INVENTION: New defective adenoviruses and corresponding complementation lines

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 42

(iv) COMPUTER-READABLE FORM:

- (A) TYPE OF MEDIUM: Tape
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS or MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Version 1.25 (European Patent Office)

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 1:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 4174)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No.: 1:
GTGACGTCTT TGGTGTTC GCGGGAAAAC 30
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 2:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 30 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 4173)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 2:
ACCGAGTAAG ATTTGTCTAG GGCCGCGGGG 30
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 3:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 33 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 4191)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 3:

GGCCATGGTC GCAGGAAAGG GACTTGACC GTT

33

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 4:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

(D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5021)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 4:

GAACGGATCC CCAGACTCTG TTTGGATTG G

31

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 5:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 30 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

- (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5157)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 5:
CCAGAAATAT CTTCGCCCAG GCCGCCGCC 30
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 6:
(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5564)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 6:
GATCCGATAT CCCGTTAAC 20
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 7:

- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
- (A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5565)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 7:
GATCGGTTAA CGGGATATCG
- 20
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 8:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
- (A) LENGTH: 47 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5892)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 8:

GTCGTAGGAT CCAGCTGCTC CCTGCTTGTG
TGTTGGAGGT CGCTGAG

47

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 9:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 47 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: YES

(vi) ORIGIN:

- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5893)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 9:

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGT

GGTGAATGGT CAAATGG

47

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 10:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 46 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5920)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 10:

ACGGTAGGAT CCGACGTCGG TGAGCTCCTC

GCTTGGTCTC CGTCCG

46

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No.: 11:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

(D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: YES

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5891)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No.: 11:

CAACCCCGAT TCTAGAGAAA CCTG

24

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 12:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 35 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

(D) CONFIGURATION: Linear

- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6079)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 12:
GCGCAGTTGC TCTGCGGATC CACTAACAT TCAGT 35

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 13:

- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 38 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6080)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 13:
TAAAAGTACC AGGTAAGGAT CCCCTTGGTT
TGCTTGGG 38

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 14:

- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 21 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6064)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 14:
GAAACCGAAT TCTCTGGAA C

21

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 15:

- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 32 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6065)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 15:

ACGAATGCAG CTCTCCACTT AACATTCAGT CG

32

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 16:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: YES

(vi) ORIGIN:

- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5481)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 16:

CAGTGAATTCAATCATCAATAATATAACC

27

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 17:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5482)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 17:
AAACTGGTCA CCGTGATTAA AAAG 24
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 18:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 25 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5455)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 18:
ATCGGAATTTC AAGATGATTA GGTAC 25
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 19:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 28 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: YES

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5456)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 19:

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC

28

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 20:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 18 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

(D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5728)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 20:

TGTAGCAGGA GGACTAAG

18

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 21:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 39 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

- (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5729)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 21:
CCGCATTAAT TAACCGCGAC AAACGATTCT
TTATTCTTG

39

- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 22:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide ([OTG] 5730)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 22:
CGCGGTTAAC TAATGCGGTA AAACCTACGT
CACCCG

36

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 23:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6060)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 23:

AATAAAAGAT CATTATTTTC ATTAGAACTG

30

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 24:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6061)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 24:
TGTGTTGGTT TTTTGTGTGT TAAT

24

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 25:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 30 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: YES

(vi) ORIGIN:

- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6062)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 25:

TAACACACAA AAAACCAACA CACAGTTCTA

30

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 26:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: YES

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6063)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 26:

ATGAAAATAA TGATCTTTA TTAT

24

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 27:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 32 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

(D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 4564)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 27:

TCCGTGAATT CTAGTAGTGT GGCGGAAGTG TG

32

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 28:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: Nucleic acid

(C) NUMBER OF STRANDS: Single

(D) CONFIGURATION: Linear

- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 4565)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 28:
TCCAGTCCGG AGAACCGGGC GCC 23
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 29:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
- (A) LENGTH: 28 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5013)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 29:
TAACCTGCAG GAGTGCCAGC GAGTAGAG 28
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 30:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
- (A) LENGTH: 21 base pairs

- (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5015)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 30:
CAACGCGCAT GCCCCATGG G 21
-
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 31:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 31 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5014)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 31:
TAGGAGATCT GTTTAAACC GCATTGGGAG G 31

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 32:

- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 34 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear

- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

- (iii) HYPOTHETICAL: NO

- (iii) ANTISENSE: NO

- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide *[No OTG code in the original French text]*

- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 32:
CGGAGTACTG TCCTCCGCGG AGTACTGTCC TCCG 34

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 33:

- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 34 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear

- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

- (iii) HYPOTHETICAL: NO

- (iii) ANTISENSE: YES

- (vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide *[No OTG code in the original French text]*

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 33:
CGGAGGACAG TACTCCGCGG AGGACAGTAC TCCG 34

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 34:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 16 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5039)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 34:

TGCTGGATAT CAGTCA

16

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 35:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5040)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 35:
GATCTGACTG ATATCCAGCA TGCA 24
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 36:
(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5024)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 36:
CTCCTGCCTA GGCAAAATAG 20
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 37:
(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 32 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single

- (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5025)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 37:
GCAGATGGAT CCGGGCGGAG TAACTTGTAT GT 32
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 38:
- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
(A) LENGTH: 31 base pairs
(B) TYPE: Nucleic acid
(C) NUMBER OF STRANDS: Single
(D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: NO
- (vi) ORIGIN:
(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5078)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 38:
GTCGCGGATC CGTTATGTTT CAACGTGTTT A 31
- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 39:

- (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 20 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear
- (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iii) ANTISENSE: YES
- (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5079)
- (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 39:
ACATGAAC TT AAGCGAGCTG

20

- (2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 40:
 - (i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:
 - (A) LENGTH: 38 base pairs
 - (B) TYPE: Nucleic acid
 - (C) NUMBER OF STRANDS: Single
 - (D) CONFIGURATION: Linear
 - (ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)
 - (iii) HYPOTHETICAL: NO
 - (iii) ANTISENSE: NO
 - (vi) ORIGIN:
 - (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 5991)
 - (xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 40:

CACGGCACCA GCTCAAGTTA ACGGATCCAT
CTGCGGGT

38

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 41:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: NO

(vi) ORIGIN:

- (A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6141)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 41:

GATCCTGTGT GTTGGTTTT TGTGTGC

27

(2) INFORMATION ABOUT I.D. SEQUENCE No. 42:

(i) CHARACTERISTICS OF THE SEQUENCE:

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: Nucleic acid
- (C) NUMBER OF STRANDS: Single
- (D) CONFIGURATION: Linear

(ii) TYPE OF MOLECULE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTISENSE: YES

(vi) ORIGIN:

(A) ORGANISM: Synthetic oligonucleotide (OTG 6142)

(xi) DESCRIPTION OF THE SEQUENCE: I.D. SEQUENCE No. 42:

GATCGCACAC AAAAAACCAA CACACAG

27

Claims

1. Adenoviral vector that is replicatively defective; that can be encapsidated in a complementation cell; and that is derived from the genome of an adenovirus that includes, from 5' to 3', a 5' ITR, an encapsidation region, an E1A region, an E1B region, an E2 region, an E3 region, an E4 region, and a 3' ITR, through the deletion of:
 - (i) Part or all of the E1A region, and all of the part of the E1B region that codes for early proteins; or
 - (ii) Part or all of the E1A region and part or all of at least one region selected from among the E2 and E4 regions; or
 - (iii) Part or all of the E1A region and part of the encapsidation region.
2. Adenoviral vector in accordance with Claim 1, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E1A region and all of the part of the E1B region that codes for early proteins.
3. Adenoviral vector in accordance with Claim 2, characterized by the fact that it is also derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E3 region.
4. Adenoviral vector in accordance with either Claim 2 or Claim 3, characterized by the fact that it is also derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E2 region.
5. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 2 to 4, characterized by the fact that it is also derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E4 region.
6. Adenoviral vector in accordance with Claim 1, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E1A region and part or all of the E2 region.

7. Adenoviral vector in accordance with Claim 1, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E1A region and part or all of the E4 region.
8. Adenoviral vector in accordance with either Claim 6 or Claim 7, characterized by the fact that it is also derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E1B region.
9. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 6 to 8, characterized by the fact that it is also derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E3 region.
10. Adenoviral vector in accordance with Claim 6, Claim 8, or Claim 9, characterized by the fact that it is also derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E4 region.
11. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 3 to 5, Claim 9, or Claim 10, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the partial deletion of the E3 region of the said genome, with the retention of the part of the said E3 region that codes for the gp 19 kDa protein.
12. Adenoviral vector in accordance with Claim 11, characterized by the fact that the part of the E3 region that codes for the gp 19 kDa protein is placed under the control of appropriate elements for the expression of the said protein in the host cell.
13. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 1 to 12, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of part or all of the E1A region and part of the encapsidation region.
14. Adenoviral vector in accordance with Claim 13, characterized by the fact that it is derived from the genome of a human adenovirus type 5, through the deletion of the part of the encapsidation region that:
 - (i) Extends from nucleotide 270 to nucleotide 346;

- (ii) Extends from nucleotide 184 to nucleotide 273; or
 - (iii) Extends from nucleotide 287 to nucleotide 358.
15. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 1 to 14, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus selected from among canine, avian, and human adenoviruses.
 16. Adenoviral vector in accordance with Claim 15, characterized by the fact that it is derived from the genome of a human adenovirus type 5.
 17. Adenoviral vector in accordance with Claim 16, characterized by the fact that it is derived from the genome of a human adenovirus type 5 through the deletion of the part of the E1B region that extends from nucleotide 1634 to at least nucleotide 4047.
 18. Adenoviral vector in accordance with Claim 16 or Claim 17, characterized by the fact that it is derived from the genome of a human adenovirus type 5, particularly through the deletion of the part of the E3 region that extends from nucleotide 27871 to at least nucleotide 30748.
 19. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 16 to 18, characterized by the fact that it is derived from the genome of a human adenovirus type 5 through the deletion of the part of the E4 region that extends from nucleotide 32800 to nucleotide 35826.
 20. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 1 to 19, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of at least 18 percent of the genome of the said virus.
 21. Adenoviral vector in accordance with Claim 20, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of at least 22 percent of the genome of the said virus.

22. Adenoviral vector in accordance with Claim 21, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of at least 40 percent of the genome of the said virus.
23. Adenoviral vector in accordance with Claim 22, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of at least 95 percent of the genome of the said virus.
24. Adenoviral vector in accordance with Claim 23, characterized by the fact that it is derived from the genome of an adenovirus through the deletion of the entirety of the genome of the said virus except for the 5' and 3' ITRs and [through the deletion] of part or all of the encapsidation region.
25. Adenoviral vector in accordance with Claim 24, characterized by the fact that it is derived from the genome of a human adenovirus type 5 through the deletion of the part of the viral genome that extends from nucleotide 459 to nucleotide 35382.
26. Adenoviral vector in accordance with any one of claims 1 to 25, characterized by the fact that it also includes an exogenous nucleotide sequence.
27. Adenoviral vector in accordance with Claim 26, characterized by the fact that it also includes a gene of interest placed under the control of the necessary elements for its expression.
28. Adenoviral vector in accordance with either Claim 26 or Claim 27, characterized by the fact that it also includes a gene that codes for a non-adenoviral transcription-stimulating trans-activator protein, with the said gene being placed under the control of the necessary elements for the expression of the said protein in a host cell.
29. Adenoviral vector in accordance with Claim 28, characterized by the fact that it includes the gene that codes for the *Saccharomyces cerevisiae* Gal4 transcription-stimulating trans-activator protein.
30. Adenovirus particle containing an adenoviral vector in accordance with any one of claims 1 to 29.

31. Eukaryotic host cell containing an adenoviral vector in accordance with any one of claims 1 to 29, or an adenovirus particle in accordance with Claim 30.
32. Complementation line that includes a complementation element, and particularly a complementation line that includes part of the E1 region of the genome on an adenovirus with the exclusion of the 5' ITR, characterized by the fact that the said complementation element is capable of complementing, in *trans* mode, a defective adenoviral vector, and also by the fact that the said complementation element is integrated into the genome of the said complementation line or inserted into an expression vector.
33. Complementation line in accordance with Claim 32, characterized by the fact that it includes particularly:
 - (i) Part or all of the E1A region of the genome of an adenovirus; and
 - (ii) Part or all of at least one region of the said genome selected from among the E1B, E2, and E4 regions.
34. Complementation line in accordance with Claim 32, characterized by the fact that it includes particularly:
 - (i) Part or all of the E1A region of the genome of an adenovirus; and
 - (ii) Part or all of at least two of the E1B, E2, and E4 regions of the said genome.
35. Complementation line in accordance with Claim 32, characterized by the fact that it includes particularly:
 - (i) Part or all of the E1A region of the genome of an adenovirus; and
 - (ii) Part or all of the E1B, E2, and E4 regions of the said genome.

36. Complementation line in accordance with any one of claims 33 to 35, characterized by the fact that it includes particularly part of all of the E1A region and all of the E1B region of the genome of an adenovirus that codes for early proteins.
37. Complementation line in accordance with any one of claims 32 to 36, characterized by the fact that it includes particularly part of the genome of an adenovirus selected from among canine, avian, and human adenoviruses.
38. Complementation line in accordance with Claim 37, characterized by the fact that it includes particularly part of the genome of a human adenovirus type 5.
39. Complementation line in accordance with Claim 38, characterized by the fact that it includes particularly the part of the genome of a human adenovirus type 5 that:
 - (i) Extends from nucleotide 100 to nucleotide 5297;
 - (ii) Extends from nucleotide 100 to nucleotide 4034; or
 - (iii) Extends from nucleotide 505 to nucleotide 4034.
40. Complementation line in accordance with either Claim 38 or Claim 39, characterized by the fact that it includes particularly the part of the E4 region of the genome of a human adenovirus type 5 that extends from nucleotide 32800 to nucleotide 35826.
41. Complementation line in accordance with Claim 38, characterized by the fact that it includes particularly the part of the genome of a human adenovirus type 5 that extends from nucleotide 505 to nucleotide 35826.
42. Complementation line in accordance with any one of claims 32 to 41, characterized by the fact that it includes part of the E1A region of the genome of an adenovirus [which part has been] deprived of its natural promoter, and by the fact that the said part is placed under the control of an appropriate promoter.

*[please see figures 1 through 11
on the 11 sheets of drawings in the original French document]*

[TRANSLATOR'S NOTE: The original document contains two sets of international search-report documents: one in French, the other in English.]

EXAMPLES

The following examples illustrate only one possible embodiment of the present invention.

The constructions described below were implemented in accordance with the general genetic engineering and molecular cloning techniques described in detail by Maniatis et al. in the *Cold Spring Harbor Laboratory Manual* (Laboratory Press, pubs., Cold Spring Harbor, New York, 1989). The series of cloning stages that implement bacterial plasmids was implemented by passage through the 5K or BJ *Escherichia coli* (*E. coli*) strain, while the stages that implement vectors derived from the M13 phage were implemented by passage through the MN 522 *E. coli* strain. For the PCR [i.e., polymerase chain reaction] amplification stages, the protocol was applied that is described in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, Gelfand, Sninsky, and White, eds.; Academic Press, Inc., 1990).

On the other hand, the cells were transfected in accordance with the standard methods that are well known to those skilled in the art. Among these, mention may be made of the calcium phosphate method (Maniatis et al., *supra*). However, other protocols that allow a nucleic acid to be introduced into a cell may also be employed, such as the DEAE [i.e., diethylaminoethyl] dextran method, electroporation, methods based on the application of osmotic shocks, the micro-injection of a selected cell, or the methods based on the use of liposomes.

The fragments that were inserted into the various constructions described below are indicated specifically in accordance with their position in the following nucleotide sequences:

- The nucleotide sequence for the genome of the adenovirus type 5 (Ad5), as disclosed in the Genebank data base under reference No. M 73260;
- The nucleotide sequence for the genome of the adenovirus type 2 (Ad2), as disclosed in the Genebank data base under reference No. J 01949; and
- The nucleotide sequence for the genome of the SV40 virus, as disclosed in the Genebank data base under reference No. J 02400.

EXAMPLE 1: Generation of a so-called "attenuated" adenovirus that includes the deletion of part of the encapsidation region.

1. Construction of a so-called "attenuated" vector that includes a deletion from nucleotide 184 to nucleotide 273 in the encapsidation region

A vector is constructed that contains the following elements:

- The 5' ITR of the genome of the Ad5 adenovirus (from nucleotide 1 to nucleotide 303);
- The encapsidation region of the Ad5 adenovirus located between nucleotides 104 to 458, in which the part extending from nucleotide 184 to nucleotide 273 is deleted, and the thymine (T) at position 1767 is modified by being transformed into a cytosine (C) in order to create an *Aat*II restriction site;
- An expression cassette for a gene of interest that includes, in the area from 5' to 3', the Ad2 MLP (from nucleotide 5779 to nucleotide 6038); the *Kpn*I–*Xba*I–*Hind*III and *Bam*HI restriction sites; the human cDNA that codes for the CFTR protein (with the amino-acid content corresponding to the sequence published by Riordan et al. in *Science*, Vol. 245 (1989), pp. 1066-1073), with the exception of a valine instead of a methionine at position 470); the *Pst*I, *Xho*I, and *Sal*II sites; and finally the signal for the termination of the transcription of the SV40 virus (i.e., nucleotides 2665 to 2538); and
- The fragment of the genome of the Ad5 extending from nucleotide 3329 to nucleotide 6241.

First the *Eco*RI–*Sma*I fragment, as isolated from pMLP11, was cloned between the *Eco*RI and *Eco*RV sites on the M13tg131 vector (as described by Kieny et al. in *Gene*, Vol. 26 (1983), pp. 91-99). This construction was derived from pMLP10 (as described by Levrero et al. in *Gene*, Vol. 101 (1991), pp. 195-202), and differed from the parental vector due to the introduction of a *Sma*I site near the *Hind*III site. The M13tg6501 vector was obtained. This vector was subjected to directed mutagenesis in order to delete the sequences located between nucleotides 184 and 273 in the encapsidation region. The

directed mutagenesis was implemented with the aid of a commercial kit (available from Arnersham) in accordance with the supplier's recommendations, and implemented the OTG 4174 oligonucleotide mentioned in connection with the identifier for Sequence No. 1 (SEQ. I.D. No. 1). The mutated vector was assigned the reference designation "M13tg6502". The encapsidation region thus deleted was reintroduced in the form of an *Eco*RI-*Bgl*II fragment, with the *Bgl*II site being freed through treatment with Klenow DNA polymerase in the pMLP11 vector digested by *Eco*RI and *Sma*I.

The resulting vector, i.e., pTG 6500, was partially digested by *Pst*I, treated with DNA polymerase from the T4 phage, and then digested by *Pvu*I. The *Pvu*I-*Hpa*I fragment, as isolated from the pTG 5955 vector (as derived from the pMLP11), was then inserted into this vector. This fragment included the signal for the termination of the transcription of the SC40 virus and the part of the genome of the Ad5 extending from nucleotide 3329 to nucleotide 6241. The pTG 6505 vector generated in this way was then partially digested by *Sph*I, treated with DNA polymerase from the T4 phage, and re-linked in order to destroy the *Sph*I site located at [position] 5' in the polylinker region. The result was the pTG 6511 vector, in which, after digestion with *Bam*HI and treatment with Klenow DNA polymerase, the human CFTR was cloned in the form of a fragment with free ends, as generated by digestion by *Xho*I and *Ava*I, and through treatment with Klenow DNA polymerase. The pTG 6525 vector was the result. For illustrative purposes, the CFTR cDNA was isolated from a plasmid in accordance with the prior art, such as the pTG 5960 vector (as described by Dalemans et al. in *Nature*, Vol. 354 (1991), pp. 526-528).

2. *Construction of a so-called "attenuated" vector that includes a deletion from nucleotide 270 to nucleotide 346 in the encapsidation region*

The M13tg6501 vector was subjected to directed mutagenesis through use of the OTG 4173 oligonucleotide (SEQ. I.D. No. 2). Then, as noted above, the mutated fragment was re-introduced into the pMLP11 vector in order to generate the pTG 6501 vector. The latter vector is digested by *Sph*I, treated with DNA polymerase from the T4 phage, and then [digested by] *Pvu*I. The pTG 6545 vector (as represented in Figure 2) was obtained through the cloning of the *Pvu*I-*Kpn*I fragment (with the *Kpn*I site having been freed) as isolated from the pTG 6525 vector and containing the human CFTR cDNA.

3. Construction of a so-called "attenuated" vector that includes a deletion from nucleotide 287 to nucleotide 358 in the encapsidation region

The M13tg6501 vector was subjected to directed mutagenesis in order to delete the sequences located between nucleotide 287 and nucleotide 358 in the encapsidation region, and in order to transform the thymines at positions 275 and 276 into guanines in order to introduce an *NcoI* site. The mutagenesis was implemented with the aid of the OTG 4191 oligonucleotide (SEQ. I.D. No. 3), and yielded the M13tg6507 vector. The latter vector was then cleaved by *Bgl*II, treated with DNA polymerase, and digested by *Eco*RI. The corresponding mutated fragment was purified and introduced into the pMLP11 digested by *Eco*RI and *Sma*I. The pTG 6504 vector was generated, from which the *Sph*I-*Pvu*I fragment was isolated (with the *Sph*I site having been freed by treatment with the DNA polymerase from the T4 phage) and then inserted between the *Kpn*I site (which was freed by treatment with the T4 polymerase) and the *Pvu*I site on the pTG 6511 vector. The result was the pTG 6513 vector, which was treated with *Bam*HI and with Klenow DNA polymerase before the *Ava*I and *Xho*I fragment from the pTG 5960 vector was added in order to produce the pTG 6526 vector.

4. Generation of a defective and attenuated recombinant adenovirus

The defective recombinant adenoviruses were generated by co-transfection, in the 293 cells, of either the pTG 6525 vector, the pTG 6526 vector, or the pTG 6546 vector, as linearized by *Cla*I, and the genomic DNA of Ad-dl324 (as described by Thimmappaya et al. in *Cell*, Vol. 31 (1982), pp. 543-551), as likewise digested by *Cla*I, so as to generate a recombinant virus by means of homologous recombination. After 8 to 10 days, the individual colonies were isolated, amplified in the 293 cells, and analyzed by means of restriction mapping. Viral stocks (AdTG 6525, AdTG 6526, and AdTG 6546) were created and their titer was determined in accordance with conventional methods.

The AdTG 6546 virus was placed in a competitive situation by co-infection with the Ad-CFTR virus (as described by Rosenfeld et al. in *Cell*, Vol. 68 (1992), pp. 143-155), which includes a wild-type encapsidation region. The 293 cells were infected with 5 CFUs [i.e., colony-forming units] of Ad-CFTR and 5 CFUs of AdTG 65467 per cell. In parallel, the total viral DNA was isolated in accordance with the Hirt method (as described by Gluzman and Van Doren in *J. Virol.*, Vol. 45 (1983), pp. 91-103), and the viral DNA was encapsidated after the cells were treated with 0.2 percent deoxydrolate and then with 10

μg per ml of deoxyribonuclease (i.e., DN[A]ase) I in order to eliminate the unprotected DNA in the virions. Although the total quantity of Ad-CFTR DNA and the total quantity of AdTG 6546 DNA were identical, there was approximately 3 times less encapsidated AdTG 6546 DNA than there was encapsidated Ad-CFTR DNA.

A measurement was made of the level of expression of the CFTR protein in the cell extracts from the 293 cells that were infected with AdTG 6546. The analysis was done by means of a Western blot, in accordance with the method described by Dalemans et al. (in *Nature* (1991) *supra*), through the implementation of the MATG 1031 monoclonal antibody. However, any other antibody that recognizes antigenic epitopes could have been used. A product was obtained that had an expected molecular weight of about 170 kDa [kiloDaltons]. For illustrative purposes, the production level is essentially the same as the one obtained in the cell extracts infected with the non-attenuated Ad-CFTR virus.

EXAMPLE 2: Generation of a so-called "attenuated" adenovirus that includes the deletion of part of the encapsidation region.

I. Acquisition of a recombinant adenovirus for expression of the CFTR protein (AdTG 6581)

Such an adenovirus was generated from a pTG 6581 plasmid vector that included, from 5' to 3', the following elements:

- The 5' ITR of the genome of the Ad5 adenovirus (from nucleotide 1 to nucleotide 103);
- The encapsidation region for the Ad5 adenovirus (from nucleotide 104 to nucleotide 458);
- An exogenous nucleotide sequence that included an expression cassette that contained the following elements:
 - The Ad2 MLP (from nucleotide 5779 to nucleotide 6038), followed by three equally divided tripartite leader sequences for the Ad2 (i.e., from nucleotide 6039 to nucleotide 6079; from nucleotide 7071 to nucleotide 7175; and from

nucleotide 9637 to nucleotide 9712). These leader sequences were included in order to increase the translation efficacy of the sequences inserted downstream;

- A polylinker region that contained, from 5' to 3', the *Xba*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RV, *Hpa*I, and *Not*I restriction sites, which could be used in the cloning of a gene of interest;
 - A gene of interest, such as the gene that codes for the CFTR protein; and
 - The signal for the termination of the isolated transcription of the SV40 virus (from nucleotide 2543 to nucleotide 2618); and
- The part of the adenoviral genome for the Ad5 adenovirus extending from nucleotide 4047 to nucleotide 6241.

The fragment of the genome of the Ad5 that extends from nucleotide 4047 to nucleotide 4614 was amplified by means of PCR [i.e., the polymer chain reaction] starting from the genomic DNA of the Ad5 adenovirus. The PCR reaction implemented the OTG 5021 sense trigger (SEQ. I.D. No. 4), which included at its 5' end a *Bam*HI site intended to facilitate subsequent cloning stages, and the OTG 5157 antisense trigger (SEQ. I.D. No. 5). The resulting fragment was treated with Klenow DNA polymerase before being cloned at the *Sma*I site on the M13mp18vector (Gibco BRL), thereby yielding the M13tg6517 vector. The sequence for the fragment generated by means of the PCR reaction was verified in accordance with the classical enzymatic method (as described by Sanger et al. in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 74 (1977), pp. 5463-5467).

The *Pvu*I-*Sma*I fragment was also isolated from the pMLP11 vector. It was cloned between the *Pvu*I and *Kpn*I sites on the pTG 6511 vector (as described in Section 1.1 in Example 1 above), with the *Kpn*I site having been freed by a treatment with DNA polymerase from the T4 phage, in accordance with standard methods. In this way the pTG 6547 vector was generated.

The pTG 6547 vector was digested by the *Sal*I and *Bst*XI enzymes and linked to two fragments, i.e., the *Bam*HI-*Bst*XI fragment purified from the M13tg6517 vector, on the one hand, and to the *Xho*I-*Bgl*II fragment of the pTG 6185 vector, on the other hand. The latter [fragment] includes particularly the signal for the termination of the

transcription of the SC40 virus enclosed within the *Xho*I and *Bgl*II restriction sites. However, any other plasmid that had the same termination sequence and adequate restriction sites could also have been used. The result is the pTG 6555 vector, into which, at the single *Bam*HI site, an adaptor was inserted that included two restriction sites, i.e., *Eco*RV and *Hpa*I, that generated free ends. This adaptor was obtained through the re-association of the OTG 5564 and OTG 5565 oligonucleotides (SEQ. I.D. No. 6 and No. 7). The result was the pTG 6580 vector. Finally, the *Sac*I–*Pst*I fragment from the pTG 6525 vector, whose ends had been freed and which included the human CFTR cDNA, was cloned at the *Eco*RV site on the pTG 6580 vector. The result of this step was the pTG 6581 vector (as represented in Figure 3).

The corresponding recombinant adenovirus AdTG 6581 was generated by means of the co-transfection of the pTG 6851 vector and of the Ad dl324 vector, as cleaved by *Clal*, in a complementation line for the E1 function, such as the 293 line or a line selected from the ones mentioned in Example 6 below, in accordance with the conventional protocol.

2. Acquisition of a recombinant adenovirus for expression of IFN γ [gamma interferon]

The pTG 6303 vector (as shown in Figure 4) was acquired through the cloning, at the *Hpa*I site on the pTG 6508 vector, of the *Hpa*I–*Sma*I fragment of an M13tg2437 vector. The latter vector was derived from the cloning, in an M13tg6130 vector (as described by Kieny et al. (1983) *supra*), of the gene that codes for gamma interferon (IFN γ), whose sequence is the one indicated by Gray et al. (in *Nature*, Vol. 295 (1982), pp. 503-508). The recombinant adenovirus AdTG 6303 was obtained in accordance with conventional methods, through homologous recombination resulting from the co-transfection of the pTG 6303 vector and the Ad dl324 vector, as linearized by *Cla*I in a complementation line for the E1 function.

3. Construction of an adenovirus from which the E1 region has been deleted and in which the E3 region is placed under the control of a constitutive promoter

The pTG 1670 vector was obtained through the cloning, between the *Aat*II site and the *Bam*HI site on the p polyII vector (as described by Lathe et al. in *Gene*, Vol. 57 (1987), pp. 193-201) of a PCR fragment that includes the 3' LTR (Long Terminal Repeat unit) of RSV (the Rous sarcoma virus). The PCR [polymerase chain reaction] involved the implementation of the pRSV/L vector (as described by De Wet et al. in *Molec. Cell. Biol.*, Vol. 7 (1987), pp. 725-737) as a matrix and the OTG 5892 and OTG 5893 primers (SEQ. I.D. No. 8 and No. 9).

Furthermore, the 5' part of the E3 region (i.e., nucleotides 27588 to 28607) was amplified starting with the pTG 1659 vector, with the aid of the OTG 5920 and OTG 5891 primers (SEQ. I.D. No. 10 and No. 11). The latter was constructed in several stages. The *Bam*HI–*Avr*II fragment (nucleotides 21562 to 28752) was obtained from the genomic DNA of Ad5, then cloned between the same sites on the pTG 7457 vector in order to generate the pTG 1649 vector. The pTG 7457 vector was a pUC 19 (Gibco BRL) vector whose polylinker was modified in such a way that it contained, in particular, an *Avr*II site. Then the *Eco*RI (Klenow)–*Avr*II fragment from the M13tg1646 vector (see Example 8 below) was introduced into the pTG 1649 vector cleaved by the *Avr*II–*Nde*I (Klenow) fragment, thereby yielding the pTG 1651 vector. Finally, the pTG 1659 vector was generated by the insertion of the *Avr*II fragment (nucleotides 28752 to 35463), as

purified from the genomic DNA of Ad5 in the pTG 1651 vector, as linearized by *Avr*II. The PCR fragment was integrated between the *Xba*I and *Bam*HI sites and the p poly II [sites] in order to yield the pTG 1671 vector. Then an *Eco*RV–*Aat*II fragment, as obtained from the pTG 1670 vector, was inserted at the *Aat*II site of the pTG 1671 vector in order to yield the pTG 1676 vector.

The *Eco*RI fragment of the Ad5, which corresponds to nucleotides 27331 to 30049, was isolated from a preparation of genomic DNA and sub-cloned in pBluescript-Sk+ (Stratagene), cleaved beforehand by *Eco*RI. The result was the pTG 1669 vector. The latter is mutated (through use of the Amersham kit) by the introduction of a *Bam*HI site, either at position 27867 (the OTG 6079 mutagen, SEQ. I.D. No. 12) or at position 28249 (the OTG 6080 mutagen, SEQ. I.D. No. 13). The results were the pTG 1672 vector and the pTG 1673 vector, respectively. The *Bam*HI–*Bsi*WI fragment that contained the 3' LTR of the RSV, followed by the 5' part of the E3 region, was isolated from the pTG 1676 vector and was inserted between the *Bam*HI site (at position 27331 or 30049) and the *Bsi*W site (at position 28390) of the vectors obtained in the preceding stage, in order to generate the pTG 1977 and pTG 1978 vectors. Then the *Eco*RI fragment obtained from each of these two vectors was integrated into the pTG 1679 vector, replacing the wild *Eco*RI fragment. The result was the pTG 1679-E3+ vector. For illustrative purposes, the pTG 1679 vector was the result of the cloning of the *Bst*EII–*Kpn*I fragment (with the site freed through treatment with the T4 polymerase) of the pTG 6590 vector (see Section 1 in Example 3 below) between the *Bst*EII–*Bam*HI sites (with the site freed through treatment with Klenow polymerase) on the pTG 6584 vector (see Section 1 in Example 3 below).

An adenovirus particle was obtained by means of homologous recombination, in a complementation lines for the E1 function, between the *Aai*II fragment of the pTG 1679-E3+ vector and an adenoviral vector such as Ad dl324 or Ad-RSV β -gal. The latter vector contained the β -galactosidase gene in the place of the E1 region (as described by Stratford-Perricaudet et al. in *J. Clin. Invest.*, Vol. 90 (1992), pp. 626-630).

EXAMPLE 3: Construction of a recombinant adenoviral vector with an improved cloning capability through the partial deletion of the E1 and E3 regions.

1. Construction of the pTG 6590 ΔE3 vector

The fragment carrying the part of the Ad5 genome located between nucleotide 27325 and nucleotide 27871 was amplified by means of the polymerase chain reaction (PCR) starting with a preparation of the genomic DNA of the Ad5 and with the aid of the OTG 6064 and OTG 6065 primers (SEQ. I.D. No. 14 and No. 15). The OTG 6064 primer included, at its 5' end, a *BsmI* site, which was also present in the E3 region (at position 30750).

The amplified fragment was cloned at the *SmaI* site of the M13mp18 vector in order to yield the M13tg6523 vector. The *EcoRI*-*BsmI* fragment was isolated from the latter vector in order to be introduced into the pTG 6590 vector, which was cleaved by the same enzymes. The result was the pTG 6590 Δ3 vector, which contained the 3' part of the adenoviral genome (from nucleotide 27082 to nucleotide 35935) with the deletion of the E3 region between nucleotides 27872 to 30740, while the pTG 6590 vector included the deletion of a smaller part of the E3 region (from position 28592 to position 30470).

The pTG 6590 vector was obtained in the following way: By means of the polymerase chain reaction (PCR), a fragment was generated that extended from nucleotide 35228 to nucleotide 35935 (including the 3' ITR), starting from a genomic Ad5 preparation and with the aid of the OTG 5481 and OTG 5482 primers (SEQ. I.D. No. 16 and No. 17). The latter fragment was then cloned at the *SmaI* site of the M13mp18 vector, in order to yield the M13tg6519 vector. Meanwhile, the pTG 6584 vector was digested by *XbaI*, and then re-linked in order to eliminate the fragment that corresponded to the E3 region. The result was the pTG 6589 vector, which was then cleaved by *BamHI*, treated with Klenow [DNA polymerase], and digested by *BstEII*. The *EcoRI* (Klenow)-*BstEII* fragment, as purified from the M13tg659 vector, was then introduced into the treated vector in order to generate the pTG 6590 vector.

For illustrative purposes, the pTG 6584 vector was a pUC 19 (Gibco BRL) vector that contained the Ad5 sequences extending from the single *SpeI* site (at position 27082) to the beginning of the promoter region in the E4 region (at position 35826). The vector in question was obtained through the digestion of the pTG 1659 vector (as described in Section 3 in Example 2 above) by *Sall* and *SpeI*, with treatment with Klenow DNA polymerase, followed by re-linking.

2. Construction of an adenovirus from which the E1 region and the part of the E3 region that does not express the gp19 kDa protein have been deleted

The part of the E3 region of the Ad5 that codes for the gp19 kDa protein (nucleotide 28731 to nucleotide 29217) was obtained by means of a polymerase chain reaction (PCR) starting with a preparation of genomic Ad5 DNA and with the implementation of the OTG 5455 and OTG 5456 primers (SEQ. I.D. No. 18 and No. 19). The resulting generated fragment was introduced at the *Sma*I site of the M13mp18 vector in order to yield the M13tg6520 vector. The *Eco*RI-*Xba*I fragment was isolated from the latter, which [*sic*] was cloned at the *Aat*II site of the pTG 1670 vector (see Section 3 in Example 2 above), with the sites having been freed by treatment with Klenow DNA polymerase. Then the *Xba*I fragment purified from the vector in the preceding stage was inserted at the *Xba*I site of the pTG 6590 ΔE3 vector (see Section 1 above in the present Example 3).

3. Acquisition of adenoviral particles

The recombinant adenoviral particles were obtained through the ligation of the *Spe*I fragments, as isolated from the genomic DNA of the AdTG 6303 or AdTG 6581 vectors, and from one or the other of the vectors described in Section 1 and Section 2 above in the present Example 3. The ligation mixture was then transfected into a complementation line for the E1 function.

EXAMPLE 4: Construction of an adenovirus from which the E1 and E3 regions have been deleted.

The parts of the adenoviral genome extending from nucleotide 31803 to nucleotide 32799 and from nucleotide 35827 to nucleotide 35935 were amplified from a preparation of genomic Ad5 DNA, with the use of the OTG 5728 and OTG 5729 primers (SEQ. I.D. No. 20 and No. 21), respectively. After approximately ten amplification cycles, the reaction was continued starting with an aliquot portion of the two reaction mixtures, with the use of the OTG 5728 and OTG 5781 oligonucleotides. The amplified fragment extended from nucleotide 31803 to nucleotide 35935, with the deletion of the entire E4 region (from position 32800 to position 35826). After digestion by *Eco*RI and *Hind*III, it

[i.e., the amplified fragment] was cloned between the same sites on the M13mp18 vector in order to yield the M13tg6521 vector.

The M13tg 6521 vector was digested by *Eco*RI, treated with Klenow DNA polymerase, and then cleaved by *Bst*XI. The 0.46 kb fragment that included the 3' ITR was inserted between the *Bam*HI site (which had been freed by means of treatment with Klenow DNA polymerase) and the *Bst*XI site on the pTG 6584 vector (as described in Section 1 of Example 3 above). The result was the pTG 6587 vector, which was digested by *Xba*I and then re-linked to itself, in order to yield the pTG 6588 vector (with the deletion of the E3 region).

A synthetic DNA fragment, created through the re-association of the OTG 6060, OTG 6061, OTG 6062, and OTG 6063 oligonucleotides (SEQ. I.D. No. 23, No. 24, and No. 25) was then introduced at the *Pac*I site of the pTG 6588 vector. The result was the pTG 8500 vector, in which the signals for the termination of the transcription of the L5 late genes were improved.

An adenoviral particle (Ad Δ E4), whose genome lacked the entire E4 region (from nucleotide 32800 to nucleotide 35826) and the *Xba*I fragment of the E3 region (from nucleotide 28592 to nucleotide 30470), was generated through the ligation of the Ad5 and the *Spe*I fragments isolated from the pTG 8500 or pTG 6588 vectors. The ligation mixture was transfected into a complementation cell line for the E4 function, such as for example the W162 line (as described by Weinberg and Ketner in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 80 (1983), pp. 5383-5386). An adenovirus that was defective for the E1 and E4 functions (Δ E1 and Δ E4) was obtained by transfection, into a complementation line for the E1 and E4 functions (for example, the line mentioned in Example 8 below), of the ligation mixture consisting of the Ad dl324 genome and the pTG 8500 or pTG 6588 plasmid as linearized by *Spe*I.

Alternatively, the procedure described below could also have been followed. The *Spe*I-*Sca*I fragment isolated from the pTG 1659 vector (as described in Section 3 of Example 2 above) is cloned in the pTG 6588 vector, as cleaved by these same enzymes, in order to obtain the pTG 6591 vector. The latter vector contains the Ad5 sequences extending from nucleotide 21062 to nucleotide 35935 but, as above, without the entire E4 region and the *Xba*I fragment of the E3 region. The synthetic DNA fragment described above is introduced into the pTG 6591 vector digested by *Pac*I, and the pTG 6597 vector

is generated. The adenoviral particles can also be obtained through the homologous recombination between the genomic Ad5 DNA of the Ad dl324 cleaved by *SpeI* and the pTG 6591 or pTG 6597 plasmid cleaved by *BamHI*.

EXAMPLE 5: Construction of a so-called "minimum" virus.

A so-called "minimum" adenoviral vector was created through the cloning, in a plasmid, of the following components:

- The 5' ITR of the Ad5 (from nucleotide 1 to nucleotide 103);
- The encapsidation region of the Ad5 (from nucleotide 104 to nucleotide 458);
- An exogenous nucleotide sequence consisting of:
 - A first gene of therapeutic interest, preferably placed under the control of its own promoter, in order to enable a regulation of the expression that will be as nearly identical as possible to natural regulation;
 - A second gene of interest, constituted from the TK HSV-1 gene; and
 - Optionally, any nucleotide sequences that may be added for reasons associated with the effectiveness of the replication or encapsidation, so that the overall size of the genome to be encapsidated is between 30 kb and 36 kb; and
 - Sequences that code for the Gal4 protein of *Saccharomyces cerevisiae* (as described by Laughon *[sic]* and Gesteland in *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 4 (1984), pp. 260-267), placed under the control of a functional promoter in a higher eukaryotic cell; and
- The 3' ITR of the Ad5 (from nucleotide 35833 to nucleotide 35935).

These various components were assembled in accordance with standard methods in molecular biology. The infectious virions that make up such a vector were obtained,

by means of the procedure described above, in a complementation line as described in Example 7 below.

EXAMPLE 6: Constitution of a complementation cell that can complement, in *trans* mode, the E1 function.

I. Constitution of a complementation cell that included the E3 region from nucleotide 100 to nucleotide 5297 (in the pTG 6533 vector)

This cell contained the following components:

- An expression cassette for the pac gene, which was placed under the control of the early promoter for the SV40 virus (from nucleotide 5171 to nucleotide 5243), and which included, at 3', the signal for the termination of the transcription of the SV40 virus (from nucleotide 2543 to nucleotide 2618). The pac gene that was utilized corresponded to a fragment extending from nucleotide 252 to nucleotide 905 in the sequence disclosed by Lacalle et al. (in *Gene*, Vol. 79 (1989), pp. 375-380) and included four mutations in comparison with the published sequence (i.e., with C at position 305 being replaced by A; with C at position 367 being replaced by T; with the insertion of a G at position 804; and with the deletion of a G at position 820); and
- A fragment of the Ad5 genome extending from nucleotide 100 to nucleotide 5297. This fragment included the E1A and E1B regions, equipped with their own promoter and with their signal for the termination of transcription, as well as a fraction of the E2 region, thereby covering the sequences that code for the IX protein.

The construction was achieved in several stages, as described in detail below. The p polyIII-I* vector (as described by Lathe et al. in *Gene*, Vol. 57 (1987), pp. 193-201) was subjected to digestion by the *Acc*I and *Eco*RI enzymes. The *Eco*RI-*Clal* fragment, as isolated from the pTG 6164 plasmid, was cloned in the treated vector. The result was the pTG 6528 vector.

The pTG 6164 plasmid was derived from pLXSN (as described by D. Miller in *Bio/Techniques*, Vol. 7 (1989), p. 980), and includes the pac gene placed under the control

of the early promoter for the SV40 virus. Briefly, the *Hind*III–*Kpn*I fragment of the pLXSN was introduced into the M13tg131 vector in order to produce the M13tg4194 vector. Into the latter, digested by *Nhe*I and *Kpn*I, was inserted the *Nhe*I–*Kpn*I fragment of pMPSV H2 K IL2R (as described by Takeda et al. in *Growth Factors*, Vol. 1 (1988), pp. 59-66), in order to produce the M13tg4196 vector. The latter vector was digested by *Hind*III–*Kpn*I, and then the fragment derived from a *Hind*III digestion and a partial *Kpn*I digestion, and purified from pLXSN, was cloned. The result was the pTG5192 vector. The latter vector was digested by *Hind*III and partially digested by *Nhe*I. Then the *Hind*III–*Nhe*I fragment from pBabe Puro (as described by Land et al. in *Nucleic Acids Res.*, Vol. 18 (1990), p. 3587) was introduced, thereby yielding the pTG 6164 vector.

The pTG 6528 vector was digested by *Pst*I. Then the *Pst*I fragment, as isolated from the pTG 6185 vector (as described in Section 1 in Example 2 above), and containing the termination signal for the transcription of the SV40 virus, was introduced at this site. The result was the pTG 6529 vector. This vector was subjected to an *Eco*RI–*Hpa*I digestion and linked to two fragments, i.e., on the one hand, a *Bsp*E1–*Bcg*I fragment (at positions 826 to 5297), as purified from the genomic Ad5 DNA, and, on the other hand, a fragment generated by means of the polymerase chain reaction (PCR) at the *Eco*RI and *Bsp*E1 ends, in order to yield the pTG 6531 vector. The PCR fragment was generated by means of genetic amplification, starting from the genomic Ad5 DNA and the OTG 4564 and OTG 4565 primers (as indicated in SEQ. I.D. No. 27 and in SEQ. I.D. No. 28). The amplified fragment was then digested by the *Eco*RI and *Bsp*E1 enzymes and ligated, as indicated in the preceding paragraph.

The pTG 6531 vector included the two transcription units (i.e., the one for the E1 region and the one for the pac gene) in the same orientation. In order to prevent any interference with the transcription process, the units were placed in a head-to-tail orientation (i.e., they were inverted in relation to one another), the pTG 6531 vector was treated with *Bam*HI, and re-ligation was performed. The pTG 6533 vector corresponded to a clone that displayed the inverse orientation of the two units.

The pTG 6533 vector was transfected into a mammalian cell line, such as for example the Vero line (ATCC, CCL81) or the A549 line (ATCC, CCL185), by means of the calcium phosphate method. The transfected cells were cultivated in accordance with the supplier's recommendations, and 24 hours after transfection were placed in a selective medium containing puromycin (at a concentration of 6 µg per ml). The resistant clones

were selected and the expression of the genes in the E1 region was evaluated in order to determine the most productive clone, which could then be used as a complementation line for the preparation of an adenovirus that was defective for the E1 function, such as the adenovirus described in detail in Example 2 above.

The expression of the sequences that coded for the early proteins in the E1 region was analyzed by means of a Northern blot, with the use of appropriate probes marked with the P-32 isotope. The production of proteins coded by the E1A region was detected by means of immunoprecipitation, after making of the cells with the S-35 isotope, and also with the aid of a commercially available antibody (Ref. No. DP11, from Oncogene Science, Inc.).

It is also possible to check and confirm the ability of the expression products of the E1A region to activate the promoter for the E1B region (by means of a Northern-blot analysis of the E1B mRNA), or their ability to activate the promoter for the E2 region (through the quantification of enzymatic activity after temporary transfection of a so-called "reporter" plasmid that contains the CAT (chloramphenicol acetyl transferase) gene placed under the control of the E2 promoter).

Finally, these cells can also be infected with Ad-RSV- β gal (as described by Stratford-Perricaudet et al. (1992) *supra*), and the virus can be titrated in accordance with the agar method, as soon as a cytopathic effect is observed. Generally speaking, the procedure described below is followed: The cells are infected at an MOI (multiplicity of infection) of 10. Approximately 48 hours after infection, when the cytopathic effect is visible, the cells are lysed and the β -galactosidase activity is quantified in accordance with the usual protocol (see for example the procedure described by Maniatis et al. (1989) *supra*). The positive clones were re-infected at a lower MOI level. Then, 48 hours after infection, the supernatant and the cells were collected in accordance with the standard methods. The viral titer was then determined in accordance with the agar method, with the use of 293 cells. The ratio of the resulting titer to the initial titer constituted the amplification factor.

2. Construction of a complementation line that included the E1 region from nucleotide 505 to nucleotide 4034 (in the pTG 6557, pTG 6558, pTG 6559, pTG 6564, and pTG 6565 vectors)

The pTG 6557, pTG 6558, and pTG 6559 vectors contained the following components:

- (i) An expression cassette for the pac gene (from nucleotide 252 to nucleotide 905, as before), under the control of the following promoters:
- The E2A promoter for Ad2 (nucleotide 27341 to nucleotide 27030 (in the pTG 6558 vector);
 - The E2A promoter for Ad2, as deleted from the sequences between nucleotide 27163 and nucleotide 27182 (for the pTG 6557 vector). Such a mutation makes it possible to reduce the base level of the E1A promoter without affecting the level of inducibility by the trans-activator protein coded by E1A; or
 - The early SV40 promoter for the pTG 6559 vector.

In all three cases, the cassette also included, at 3', the signal for the termination of the transcription of the SV40 virus (from nucleotide 2543 to nucleotide 2618); and

- (ii) An expression cassette that included the part of the E1 region in the Ad5 genome extending from nucleotide 505 to nucleotide 4034. This part of the adenoviral genome contained all of the sequences that code for the early proteins in the E1A region, the signal for the termination of the transcription of the E1A unit, the E1B promoter (which is inducible by the trans-activator protein coded by E1A) and all of the coding sequences in the E1B region. It also included the sequences that code for the IX protein, which sequences overlapped the E1B region. Nevertheless, it was deprived of the promoter for the E1A region and the signal for the termination of the transcription of the E1B and IX transcription units. In order to allow the expression of the sequences for the E1 region, the promoter for the murine PGK gene was introduced at 5', and the signal for the termination of the transcription of the β -globin rabbit gene was introduced at 3' (i.e., nucleotides 1542 to 2064 in the sequence disclosed in the Genebank data base at Ref. No. K 03256).

As an option, any other nucleotide sequences, such as for example sequences isolated from pBR322 (as described by Bolivar et al. in *Gene*, Vol. 2 (1977), pp. 95-113), could also have been introduced between the expression cassettes for the pac gene and for the E1 region in order to avoid any interference with the transcription process.

These vectors were constructed in several stages, as described below.

First of all, a polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the part of the Ad5 genome that extends from nucleotide 505 to nucleotide 826, starting from a genomic preparation and with the use of the OTG 5013 primer (SEQ. I.D. No. 29), which included at 5' a *PstI* site that could be useful in the subsequent cloning stages, and the OTG 4565 primer (SEQ. I.D. No. 28), which overlapped the *BspE1* site. The fragment generated by means of the PCR was treated with Klenow DNA polymerase and then introduced at the *SmaI* site on the M13mp18 vector, thereby yielding the M13tg6512 vector. The sequence of the PCR fragment was checked and confirmed.

The pTG 6533 vector (as described in Section 1 of the present Example 6) was digested by the *EcoRI* and *BspE1* enzymes. The treated vector was linked, on the one hand, with the *PstI*-*BspE1* fragment isolated from the M13tg6512 vector and, on the other hand, with the *EcoRI*-*PstI* fragment isolated from pKJ-I. The latter included the part of the promoter for the murine PGK gene located between nucleotide -524 and nucleotide -10, whose sequence was reported by Adra et al. (in *Gene*, Vol. 60 (1987), pp. 65-74). This stage resulted in the production of the pTG 6552 vector, and allowed the insertion of the promoter for the murine PGK gene upstream of the E1 region in the Ad5 genome, starting at nucleotide 505.

Furthermore, the *XhoI*-*BamHI* fragment, in which the termination generated by the *XhoI* was cleared by means of treatment with Klenow DNA polymerase, was purified from pBCMG Neo (as described by Karasuyama et al. in *J. Exp. Med.*, Vol. 169 (1989), pp. 13-25). This fragment, which included the signal for the termination of the transcription of the β-globin rabbit gene, was introduced between the *SmaI* and *BamHI* sites on the p polyII-Sfi/Not-14* vector (as described by Lathe et al. in *Gene*, Vol. 57 (1987), pp. 193-201). The resulting pTG 6551 vector protein was digested by the *SphI* and *EcoRV* enzymes, in order to allow the insertion of a fragment of the Ad5 genome that extended from nucleotide 3665 to nucleotide 4034. This fragment was generated by means of the PCR reaction, in accordance with the standard procedure. A preparation of genomic Ad5 DNA was used as a matrix, along with the OTG 5015 primer (SEQ. I.D. No. 30, which covered the internal *SphI* site at position 3665), and the OTG 5014 primer (SEQ. I.D. No. 31, which included a *BglII* site at 5').

The PCR fragment was treated with Klenow DNA polymerase before being cloned at the *Sma*I site of the M13mp18 vector, thereby generating the M13tg6516 vector. After its sequence was checked and confirmed, the PCR fragment was subjected to digestion by *Bgl*II, treatment with Klenow DNA polymerase, and digestion by *Sph*I. It was then inserted between the *Sph*I and *Eco*RV sites on the pTG 6551 vector. The result was the pTG 6554 vector.

Furthermore, the pTG 6529 vector (as described in Section 1 in the present Example 6) was subjected to digestion by the *Hpa*I and *Hind*III enzymes. The 2.9 kb fragment that included the pac gene, followed by the signal for the termination of the transcription of the SV40 virus, was purified and linked to the *Sma*I–*Hind*III fragment isolated from pE2 Lac (as described by Boeuf et al. in *Oncogene*, Vol. 5 (1990), pp. 691-699) which carried the E2A promoter for the Ad2 genome. The result was the pTG 6556 vector. As an alternative, it could have been linked to the *Sma*I–*Hind*III fragment that was isolated from pE2 Lac D9170 (as described by Zajchowski et al. in *EMBO J.*, Vol. 4 (1985), pp. 1293-1300) which carried the mutated E2A promoter for the Ad2 genome. In this case the result would have been the pTG 6550 vector.

The pTG 6556 vector was digested by the *Eco*RI and *Bam*HI enzymes. Two fragments were then inserted between these sites, i.e., the *Eco*RI–*Sac*II fragment, as isolated from the pTG 6552 vector, and the *Sac*II–*Bam*HI fragment, as isolated from the pTG 6554 vector. The result was the pTG 6558 vector. The same procedure, as applied to the pTG 6550 and pTG 1643 vectors (as described in Section 1 in Example 7 below), generated the pTG 6557 and pTG 6559 vectors, respectively.

The pTG 6557 and pTG 6558 vectors were digested by *Eco*RV, [at a] single site located between the two expression cassettes (i.e., for the pac gene and for the E1 region). At this site, a 1.88 kb *Eco*RV–*Pvu*II fragment, as isolated from pBR322 (as described by Bolivar et al., *supra*), was cloned in order to separate the two promoters. The pTG 6564 and pTG 6565 vectors were generated, respectively.

The pTG 6557, pTG 6558, pTG 6559, pTG 6564, and pTG 6565 vectors were transfected into the A549 cell line. As in the procedure described above, the clones were selected that were resistant to puromycin, and the expression of the E1 region was checked and confirmed. The clones that expressed the E1 region were earmarked for the amplification and propagation of adenoviruses that were defective for the E1 function. The production

of E1 expression products was accompanied by a cytotoxic effect; however, a Southern blot analysis did not allow a determination of any rearrangements of the vectors. After infection by Ad-RSV- β -gal, it was found that several clones were capable of amplifying the virus by a factor of more than 100.

3. *Construction of a complementation cell that was inducible by the Gal4 protein of *Saccharomyces cerevisiae**

As before, these vectors included the part of the E1 region of the Ad5 genome extending from nucleotide 505 to nucleotide 4034. However, the expression of the sequences for the E1A region was placed under the control of an inducible promoter consisting, on the one hand, of the minimal Ad2 MLP promoter (i.e., a TATA box and the signal for the initiation of transcription, from nucleotide -34 to nucleotide +33), and, on the other hand, of a sequence for the activation of the Gal 10 gene, activatable by the Gal4 protein. The consensus sequence for the activation of 17 nucleotides (17MX), which corresponds to the fixation site for the Gal4, was specified by Webster et al. (in *Cell*, Vol. 52 (1988), p. 169). The termination signal for the transcription of the β -globin rabbit gene was placed at the 3' position in the E1B transcription unit.

A first DNA fragment was synthesized that included a dimer in the 17MX sequence (SEQ. I.D. No. 32 and No. 33), followed by the minimal Ad2 MLP promoter. The 5' end of this fragment contained an *Sal*I site, and the 3' end contained a *Bam*HI site. The *Sal*I site was cleared by means of treatment with Klenow DNA polymerase. Then a second DNA fragment was synthesized that included a pentamer of the sequence, followed by the same promoter and containing *Xba*I and *Bam*HI sites at the 5' and 3' extremities, respectively. After digestion by *Xba*I, the extremity was cleared by means of treatment with Klenow DNA polymerase.

Each of these fragments was introduced into the *Bgl*II site of the p polyII vector in order to generate the pTG 1656 and pTG 1657 vectors, respectively. Then the following two fragments were introduced into each of the vectors previously digested by *Pst*I-*Bam*HI: the *Psfl*-*Xba*I fragment, as isolated from the pTG 6552 vector (as described in Section 2 in the present Example 6), and the *Xba*I-*Bam*HI fragment, as isolated from the pTG 6559 vector (likewise described in Section 2 in the present Example 6). The results were the pTG 1660 and pTG 1661 vectors, respectively (as shown in Figure 5 below).

The A549 cells were co-transfected with the pTG 1643 vector (i.e., the expression vector for the pac gene) and with either the pTG 1660 or the pTG 1661 vector. The clones were selected on the basis of their resistance to puromycin, and were studied in accordance with the procedures described above. Approximately 50 percent of the A549-1660 and A549-1661 clones produced expression products for the E1 region. However, this production was accompanied by a cytotoxic effect, which affected the morphological appearance of the cells.

The integration and non-re-arrangement of the plasmids in the cell genome was verified by means of a Southern-blot analysis. No substantial modification of the integrated plasmids (i.e., pTG 1643, pTG 1660, and pTG 1661) could be detected in the producer clones that were analyzed. It was also possible to check and confirm the inducibility of the expression of the sequences coded by the E1A region in the presence of Gal4 (by means of transformation by a plasmid, so as to allow the constitutive expression of the Gal4 protein).

After the infection of several producer clones with Ad-RSV- β gal at an MOI [multiplicity of infection] level of approximately 2, two A549-1660 clones were found to be capable of amplifying the viral stock by a factor of more than 100.

EXAMPLE 7: Constitution of a complementation lines for all of the functions that are essential to the replication of an adenovirus.

A vector was constructed that included the entire Ad5 adenoviral genome, with the exception of the 5' ITR, the 3' ITR, and the encapsidation region.

The pTG 6528 vector (as described in Section 1 in Example 6 above) was digested by the *Pst*I and *Bgl*II enzymes, between which was inserted a fragment of DNA that had been chemically synthesized in accordance with the standard protocol [and that was] constituted by the OTG 5039 and OTG 5040 oligonucleotides (SEQ. I.D. No. 34 and No. 35). The oligonucleotide sequence was designed in such a way as not to reconstitute the *Pst*I cloning site and to introduce an *Eco*RV site. The result was the pTG 1639 vector, which was linearized by digestion by *Eco*RV and linked to an *Xba*I-*Bam*HI fragment whose ends had been cleaved by treatment with Klenow DNA polymerase. This fragment was the carrier of the signal for the termination of the transcription of the

SV40 virus. Any plasmid that contains a signal surrounded by adequate restriction sites could have been utilized in this stage.

The resulting pTG 1640 vector was digested by *Bam*HI and *Bgl*II, and the fragment that was the carrier of the expression cassette for the pac gene was introduced into the *Bgl*II site of the pPolyII-Sfi/Not-14* vector. The result was the pTG 1641 vector. The latter vector was linearized by *Not*I and treated with Klenow DNA polymerase. The 0.276 kb *Bam*HI-*Sal*I fragment, as isolated from pBR322 (as described by Bolivar et al., *supra*) and also treated with Klenow DNA polymerase, was then introduced, thereby giving rise to the pTG 1643 vector.

The pTG 1643 was linearized by *Xho*I, and at this site a hybrid *Xho*I fragment was then inserted that included a 17MX dimer followed by the minimal promoter of the TK HSV-1 gene (extending from nucleotide 303 to nucleotide 450 in the sequence disclosed in the Genebank data base under Ref. No. V 00467, and completed by an *Xho*I site at the 3' end). The result was the pTG 1647 vector, in which the hybrid promoter 2x17MX-TK-HSV-1 was inserted with the same orientation as the expression cassette for the pac gene.

This construction, pTG 1647, served as a basic vector for the introduction, between the *Pst*I and *Bam*HI sites, of a fragment of the Ad5 genome extending from nucleotide 505 to nucleotide 35826. The pTG 1647 was first digested by *Pst*I and *Bam*HI and then linked, on the one hand, to the *Pst*I-*Cla*I fragment of the pTG 6552 vector (as described in Section 2 in Example 6 above) that contained the part of the Ad5 genome extending from nucleotide 505 to nucleotide 918, and, on the other hand, to the *Cla*I-*Bam*HI fragment (at positions 918 to 21592) as prepared from the genomic Ad5 DNA. The resulting vector contained the 5' part of the Ad5 genome, except for the 5' ITR and the encapsidation region.

Furthermore, the 3' part of the Ad5 genome was assembled in the p polyII-Sfi/Not-14* vector. The latter was linearized by *Bam*HI, and the *Bam*HI-*Avr*II fragment (extending from nucleotide 21562 to nucleotide 28752) of the Ad5 genome was introduced, along with a PCR fragment that corresponded to [the part extending from] nucleotide 35462 to nucleotide 35826 of the Ad5 genome. The latter [fragment] was generated from the genomic DNA of the Ad5 and from the OTG 5024 and OTG 5025 primers (SEQ. I.D. No. 36 and No. 37, respectively), and included a *Bam*HI site at the 5' end. The resulting

vector was digested by *Avr*II, and the *Avr*II fragment, as isolated from the genomic Ad5 DNA and extending from position 28753 to position 35462, was inserted.

The *Bam*HI fragment that contained the adenoviral sequences was introduced at the *Bam*HI site of the vector from the preceding stage that contained the 5' part of the adenoviral genome deprived of the 5' ITR and the encapsidation region.

A complementation line that was capable of complementing all of the functions of a defective adenovirus was generated by means of transfection in a cell line, such as the A549 line, in accordance with the procedure described in the preceding examples.

It was also possible to proceed by means of the construction of four vectors, as indicated below, that included almost all of the adenoviral genome, which would then have been reassembled on a single vector during the final stage, e.g.:

- The pTG 1665 vector, which corresponded to the cloning of the *Bsp*E1 fragment (from nucleotide 826 to nucleotide 7269), as isolated from a preparation of the genomic Ad5 DNA, at the *Xma*I site of the p poly II-Sfi/Not-14* vector;
- The pTG 1664 vector, which was generated by the insertion of the *Not*I fragment (from nucleotide 6503 to nucleotide 1504), as isolated from a preparation of the genomic Ad5 DNA, at the *Not*I site of the same vector mentioned above;
- The pTG 1662 vector, which was obtained through the introduction of the *Aat*I fragment (from nucleotide 10754 to nucleotide 23970), as isolated from a preparation of the genomic Ad5 DNA, at the *Aat*I site of the p polyII vector; and
- The pTG 1659 vector, which contained the 3' part of the Ad5 genome (as described in Section 3 in Example 2 above).

Then a fragment was introduced that included an inducible expression system, such as the promoter described in Section 3 in Example 6 above, or in the present Example 7, that was inducible by Gal4, or a promoter known in the prior art, such as the metallothioneine or tetracycline promoter. Such a fragment was placed upstream of the 5' sequences in the Ad5 (extending from nucleotide 505 to nucleotide 918) in the pTG 1665 vector digested

by *Aat*II and *Cla*I. Finally, the *Not*I fragment of the pTG 1664 vector, the *Aat*II fragment of the pTG 1662 vector, and, lastly, the *Bam*HI fragment of the pTG 1659 vector were cloned in the preceding vector and at the corresponding sites.

A complementation line was generated by co-transfection of the preceding vector and of the pTG 1643 vector, and the clones that were resistant to puromycin were isolated. This line was more particularly intended for use in the amplification and encapsidation of the adenoviral vectors in Example 5 above that were defective for the E1, E2, and E4 functions and for the late functions.

EXAMPLE 8: Constitution of a complementation lines for the E1 and E4 functions.

The pTG 1647 vector (as described in Example 7 above) was digested by the *Pst*I–*Bam*HI enzymes, and the following three fragments were introduced into the treated vector:

- The *Pst*I–*Xba*I fragment of the pTG 6552 vector (as described in Section 2 in Example 6 above) that carried the Ad5 sequences from nucleotide 505 to nucleotide 1339;
- The *Xba*I–*Sph*I fragment of the pTG 6552 vector that carried the Ad5 sequences from nucleotide 1340 to nucleotide 3665;
- The *Sph*I–*Bam*HI fragment of the pTG 6554 vector (as described in Section 2 in Example 6 above) that carried the Ad5 sequences from nucleotide 3665 to nucleotide 4034 and a signal for the termination of the transcription.

The vector obtained in this way was cut by *Bam*HI, and the following three fragments were introduced at this site:

- A fragment digested by *Bam*HI–*Afl*II, as generated by means of a PCR [polymerase chain reaction], that corresponded to the Ad5 sequence located between position 32800 and position 33104. The genomic Ad5 DNA was used as a matrix, and the primers used were OTG 5078 (SEQ. I.D. No. 38) and OTG 5079 (SEQ. I.D. No. 39);

- The *Afl*II–*Avr*II fragment, as isolated from the genomic Ad5 (from nucleotide 33105 to nucleotide 35463); and
- The *Avr*II–*Bam*HI fragment, as generated by means of a PCR with the aid of the OTG 5024 and OTG 5025 primers (see Example 7 above).

The vector generated in this way was introduced into a cell line in accordance with the procedure described earlier, in order to form a complementation line for the E1 and E4 functions.

Furthermore, such a line could also have been obtained in accordance with the following procedure:

The E4 region of the Ad5 genome (from nucleotide 32800 to nucleotide 35826) was reconstituted in several stages. The part extending from nucleotide 33116 to nucleotide 32800 was synthesized by means of a polymerase chain reaction (PCR) starting with the genomic Ad5 DNA with the pair of primers OTG 5078 and OTG 5079 (SEQ. I.D. No. 38 and No. 39, respectively), and then inserted at the *Eco*RV site of the M13tg130 vector, in order to generate the M13tg1645 vector.

The *Bam*HI–*Afl*II fragment of the latter was engaged in a ligation reaction with the *Afl*II–*Avr*II fragment of the Ad5 (from nucleotide 33104 to nucleotide 35463), and the pTG 7457 vector was digested by *Bam*HI and *Avr*II. The result was the pTG 1650 vector.

Then the E4 region was completed through the acquisition of the fragment corresponding to nucleotides 35826 to 35457, by means of a polymerase chain reaction (PCR) starting with a preparation of genomic Ad5 DNA and the primers OTG 5024 and OTG 5025 (SEQ. I.D. No. 36 and No. 37, respectively). The latter was inserted at the *Sma*I site of the M13mp18 vector in order to yield the M13tg1646 vector. The *Avr*II–*Eco*RI fragment was isolated from the latter and cloned between the *Avr*II and *Eco*RI sites on the pTG 1650 vector. The result was the pTG 1652 vector.

The *Bam*HI fragment that included the E4 region of the Ad5 genome was isolated from the pTG 1652 vector and cloned at the *Bam*HI site of the pTG 1643 vector, the pTG 6559 vector (as described in Section 2 of Example 6 above), or at the *Ssp*I site of the pTG 6564 vector (likewise described in Section 2 of Example 6 above), after the sites had been

cleared, in order to generate the pTG 1653, pTG 1654, and pTG 1655 vectors (as shown in Figure 6), respectively.

Conventional methods were utilized to generate a complementation cell that could complement, in *trans* mode, the E1 and E4 functions, by means of the following steps:

- (1) Transformation of the pTG 1653 vector in the 293 cell line, or
- (2) Transformation of the pTG 1654 or pTG 1655 vector in the A549 cell line.

The expression of the products of the E1 and E4 regions was usually accompanied by a cytotoxic effect. A number of the 293-1653 clones were capable of complementing both the adenoviruses that had been deprived of the E1 function and the adenoviruses that had been deprived of the E4 function.

Another alternative consisted of proceeding in the manner described below.

The M13tg1646 vector was subjected to directed mutagenesis with the mutagen oligonucleotide OTG 5991 (SEQ. I.D. No. 40), in order to delete the promoter for the E4 region and to insert an *Hpa*I site. The mutated vector was designated as "M13tg6522". It was digested by *Pst*I, treated with DNA polymerase from the T4 phage, and then treated with *Avr*II and placed in ligation with an *Eco*RI (Klenow)-*Avr*II fragment that had been purified from the pTG 1652 vector (as described in the present Example 8), in order to yield the pTG 6595 vector. The latter vector was cleaved by *Hpa*I, and the 0.8 kb fragment obtained from the pTG 5913 vector (as shown in Figure 7 below) was introduced, after digestion with *Bgl*II and *Bam*HI and treatment with Klenow [DNA polymerase]. The pTG 6596 vector was generated in which the E4 region (from position 32800 to position 35826) was placed under the control of the TK promoter. For the sake of illustration, the pTG 5913 vector carried the TK HSV-1 gene and the *Bgl*II-*Bam*HI fragment corresponded to the promoter for this gene (as described by Wagner et al. in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 78 (1981), pp. 1441-1445).

Similarly, the pTG 1643 and pTG 6559 vectors (as described in Example 6 above) were linearized by *Bam*HI, and a synthetic fragment was inserted that was obtained through the reassociation of the OTG 6141 and OTG 6142 oligonucleotides (SEQ. I.D. No. 41 and No. 42, respectively), in order to obtain the pTG 8508 and pTG 8507 vectors, respectively. The latter vectors were cleaved by *Bam*HI before the introduction of

the *Bam*HI fragment that had been purified from the pTG 6596 vector carrying the E4 expression cassette. The pTG 8512 vector (shown in Figure 8 below) and the pTG 8513 vector (shown in Figure 9 below) were then generated.

Furthermore, the introduction of the *Bam*HI fragment of the pTG 1652 vector into the pTG 8508 or pTG 8507 vector, as linearized by the same enzyme, results in the [creation] of the pTG 8514 and pTG 8515 vectors, respectively (as shown in figures 10 and 11 below).

The cell lines transfected by the pTG 8512 or pTG 8515 vector will make it possible to complement an adenovirus that is defective for the E4 function, whereas the cell lines resulting from the transfection of the pTG 8513 or pTG 8514 vector are intended to amplify and propagate adenoviruses that are defective for the E1 and E4 functions. Similarly, the transfection of the pTG 8512 or pTG 8515 vector into 293 cells will make it possible to complement adenoviruses that are defective for the E1 and E4 functions.

WO 94 / 28152

PCT / FR94 / 00624

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.